



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLOGICAS
DEPARTAMENTO DE ECOLOGIA

Memoria presentada por M^a LUISA BERINGOLA BERINGOLA
para optar al Grado de Doctor

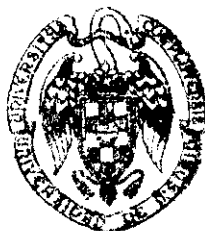
"GENOTOXICIDAD DE LAS AGUAS DEL RIO TAJO"

Dirigida por la Doctora MERCEDES HERNANDEZ ASENSIO, Profesora Titular de Universidad del Dpto. de Biología Animal II, U.C.M. y por el Doctor BARTOLOME RIBAS OZONAS, Jefe de Area de Toxicología del Inst. de Salud Carlos III.

Fdo.: M^a Luisa Beringola Beringola

Fdo.: Mercedes Hernandez Asensio

Fdo.: Bartolome Ribas Ozonas



Archivos

Madrid, 1996

Quisiera expresar mi agradecimiento a mis Directores de Tesis, la Dra. Mercedes Hernandez Asensio, profesora del Departamento de Biología Animal II y al Dr. Bartolome Ribas Ozonas, Jefe de Area de Toxicología, por su eficaz apoyo científico, paciencia y colaboración desinteresada en todo momento, sin la cual no habría podido realizar esta Tesis.

Al Director del Departamento de Ecología, Dr. Francisco Díaz Pineda, el cual accedio a ser mi tutor.

A todo el personal del Servicio de Toxicología, y en especial a la Sección de Ensayos Biologicos del Instituto de Salud Carlos III: Mayte Pollastrini, Marta Barea, Carmen Rubio, por permitirme concluir este trabajo y observaciones acerca del mismo; así como a Estrella Bouza, Paquita Guerrero, Mercedes Escaso y Arrate, por su laboriosa e inestimable ayuda en el laboratorio.

A Dña Carmen Riobos y Guadalupe Martinez ambas pertenecientes al Centro Regional de Salud Pública de Talavera de la Reina, por su colaboración y amabilidad.

A Manuel Macia, doctorando del Departamento de Biología Animal II, por su valiosa ayuda prestada para la impresión de esta Tesis.

Finalmente a toda mi familia por el tiempo que les ha restado la realización de este trabajo.

A mis hijos:

Alvaro, Alejandro, Beatriz y Rafael

INDICE

I.	INTRODUCCION.....	1
	1. CONTAMINACION ACUATICA.....	2
	1.1. Tóxicos ambientales: categorías, características, factores	14
	2. GENOTOXICIDAD.....	21
	3. VALORACIÓN DEL RIESGO GENOTÓXICO	28
	3.1. Correlación Carcinogenicidad/Mutagenicidad.....	28
	3.2. Riesgo genotóxico.....	30
	3.3. Estructura química\mutagénico\carcinógenos	33
	4. ENSAYOS DE GENOTOXICIDAD	41
	4.1. Validación de los ensayos genotóxicos.....	41
	4.2. Clasificación de los ensayos de genotoxicidad	43
	4.2.1. Ensayos pre-mutagénicos basados en la QSRA	45
	4.3. Estrategias para determinar el riesgo genotóxico:	
	baterías de ensayos	46
	4.3.1. Importancia del Test de Ames	50
	5. ACTIVACION METABOLICA	51
	5.1. Fracción postmitocodrial de hígado de rata (S9)	52
	5.2. Inducción enzimática	56
II.	OBJETIVOS	57
III.	DESCRIPCION DEL AREA DE ESTUDIO	60
	1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA ZONA	61
	2. PUNTOS DE MUESTREO: LOCALIZACIÓN Y VERTIDOS	67
	3. PARÁMETROS FISICO-QUÍMICOS	74
IV.	MATERIALES Y MÉTODOS	76
	1. MATERIALES	77
	1.1. Material no biológico	77

1.1.1. Muestras de agua	77
1.1.2. Productos químicos	78
1.1.2.1. Relativos a la fracción microsomal S9 mix	78
1.1.2.2. Mutágenos standard	79
1.1.2.3. Disolventes de extracción de materia orgánica	79
1.1.2.4. Disoluciones	79
1.1.2.5. Medios de cultivo	80
1.1.3. Material desechable	82
1.2. Material biológico	82
1.2.1. Cepas bacterianas	82
1.2.1.1. <i>Salmonella typhimurium</i> cepa TA1535	85
1.2.1.2. <i>Salmonella typhimurium</i> cepa TA1538	85
1.2.1.3. <i>Salmonella typhimurium</i> cepa TA98	86
1.2.1.4. <i>Salmonella typhimurium</i> cepa TA100	86
1.2.2. Ratas para la obtención de la fracción microsomal de hígado , S9	86
2. MÉTODOS	88
2.1. Tratamiento de las muestras	88
2.1.1. Recogida de muestras	88
2.1.2. Concentración de la materia orgánica del agua	89
2.1.3. Preparación de las muestras	92
2.2. Obtención de la fracción microsomal S9	92
2.2.1. Tratamiento de los animales: inducción enzimática	92
2.2.2. Obtención del homogeneizado de hígado de rata	92
2.2.3. Fracción S9-mix	93
2.3. Métodos de procesamiento de cepas bacterianas	94
2.3.1. Obtención y conservación de las cepas	94
2.3.2. Regeneración	95
2.3.3. Curvas de crecimiento	96
2.3.4. Verificación de las características genotípicas de las cepas .	96
2.3.4.1. Concentración celular	97
2.3.4.2. Requerimiento de histidina	97

2.3.4.3. Sensibilidad al cristal violeta	97
2.3.4.4. Sensibilidad a la luz ultravioleta	98
2.3.4.5. Resistencia a la ampicilina	99
2.3.4.6. Mutación espontánea	100
2.3.4.7. Respuesta al mutágeno estandar	103
2.4. Ensayo de mutagenicidad con <i>Salmonella typhimurium</i>	104
2.4.1. Ensayo de incorporación en placa	104
2.4.2. Controles de esterilidad de los ensayos con <i>Salmonella typhimurium</i>	106
2.5. Cuantificación del efecto mutagénico	109
2.5.1. Método basado en el cálculo del índice de mutación	109
V. RESULTADOS	110
1. PRESENTACIÓN: TABLAS, DIAGRAMAS Y VARIABLES	111
2. ESTUDIO DE LA GENOTOXICIDAD POR PUNTOS DE MUESTREO: ENSAYO 1,2, Y 3	114
2.1. Punto 1	114
2.2. Punto 2	119
2.3. Punto 3	123
2.4. Punto 4	127
2.5. Punto 5	131
3. ESTUDIO DE LA GENOTOXICIDAD POR CEPAS BACTERIANAS: ENSAYOS 1,2 Y 3	139
3.1. Cepa TA1535	139
3.2. Cepa TA1538	142
3.3. Cepa TA98	145
4.4. Cepa TA100	148
VI. DISCUSIÓN	153
VII. CONCLUSIONES	192

VIII. BIBLIOGRAFÍA 196

IX. APÉNDICES 211

INDICE DE FIGURAS

INTRODUCCIÓN Figuras 1 a 12

Figura 1. Representa el origen e intercambio de algunos xenobióticos	4
Figura 2. Relación de solapamiento entre compartimentos ambientales	5
Figura 3. Relación entre sustancias de origen diversos y sus efectos	14
Figura 4. Inducción de un efecto carcinógeno mediante una mutación	27
Figura 5. Diferencias moleculares en relación a su toxicidad	36
Figura 6. Sustancias que contienen el grupo "azo"	37
Figura 7. Correlación entre los valores de sensibilidad en el ensayo	40
Figura 8. Valor predictivo de los test de mutagenicidad	43
Figura 9. Principales métodos de estudio de la genotoxicidad	45
Figura 10. Organismos oficiales para la validación de un producto químico	48
Figura 11. Guía de ensayos de mutagenicidad	49
Figura 12. Enzimas presentes en el sobrenadante postmitocondrial	54

DESCRIPCIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO Figuras 13 a 20

Figura 13. Datos mensuales de precipitación: Puebla de Montalban	63
Figura 14. Datos mensuales de precipitación: Carpio de Tajo	64
Figura 15. Datos mensuales de precipitación: Cazalegas	64
Figura 16. Datos mensuales de precipitación: Cabanuelas	65
Figura 17: Datos mensuales de precipitación: La Estrella	65
Figura 18: Datos mensuales de precipitación: Puente de Arzobispo	66
Figura 19: Datos mensuales de precipitación: El Guardaperal	66
Figura 20: Mapa del área de estudio	68

MATERIALES Y MÉTODOS Figuras 21 a 22

Figura 21. Mapa de genes del operón de his	84
Figura 22. Ensayo de incorporación en placa. Test de Ames	107

RESULTADOS Figuras 23 a 34

Figura 23. Punto 1, ensayo 1, 1ª, 2ª y 3ª fracción	117
Figura 24. Punto 2, ensayo 1, 1ª, 2ª y 3ª fracción	121
Figura 25. Punto 3, ensayo 1, 1ª, 2ª y 3ª fracción	125
Figura 26. Punto 4, ensayo 1, 1ª, 2ª y 3ª fracción	129
Figura 27. Punto 5, ensayo 1, 1ª, 2ª y 3ª fracción	133
Figura 28: Puntos de muestreo , 1ª fracción	135
Figura 29: Puntos de muestreo , 2ª fracción	136
Figura 30: Puntos de muestreo , 3ª fracción	137
Figura 31: Punto 5, 1ª, 2ª y 3ª fracción	138
Figura 32. Cepas bacterianas, 1ª fracción	150
Figura 33. Cepas bacterianas, 2ª fracción	151
Figura 34. Cepas bacterianas, 3ª fracción	152

INDICE DE TABLAS

DESCRIPCIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO	Tabla 1
Tabla 1. Parámetros fisicoquímicos de las aguas del río Tajo	75
MATERIALES Y MÉTODOS	Tablas 2 a 7
Tabla 2. Genotipos de las cepas bacterianas de <i>Salmonella typhimurium</i>	87
Tabla 3. Mutación espontánea	100
Tabla 4. Respuesta a mutágenos estandar sin S9	103
Tabla 5. Respuesta a mutágeno estandar con S9	104
Tabla 6. Ensayo de incorporación en placa sin S9	108
Tabla 7. Ensayo de incorporación en placa con S9	108
APÉNDICE	Tablas básicas 1 a 7

INDICE DE CUADROS RESUMEN

RESULTADOS	Cuadros 1 a 9
Cuadro 1. Muestras genotóxicas correspondientes al punto 1	118
Cuadro 2. Muestras genotóxicas correspondientes al punto 2	122
Cuadro 3. Muestras genotóxicas correspondientes al punto 3	126
Cuadro 4. Muestras genotóxicas correspondientes al punto 4	130
Cuadro 5. Muestras genotóxicas correspondientes al punto 5	134
Cuadro 6. Muestra genotóxicas con respecto a la cepa TA1535	141
Cuadro 7. Muestra genotóxicas con respecto a la cepa TA1538	144
Cuadro 8. Muestra genotóxicas con respecto a la cepa TA198	147
Cuadro 9. Muestra genotóxicas con respecto a la cepa TA1100	149

INDICES DE FOTOGRAFIAS

MATERIALES Y MÉTODOS Fotografías 1 a 4

Fotografía 1. Control de la mutación *rfa*: sensibilidad al cristal violeta 98

Fotografía 2. Control de la mutación factor R 99

Fotografía 3. Mutación espontánea 102

Fotografía 4. Control positivo, mutágeno estandar 102

I- INTRODUCCIÓN

1. ORIGEN DE LA CONTAMINACION ACUATICA

Desde tiempo inmemorial las aguas continentales, han sido el medio mas utilizado para eliminar los productos de desecho. Hasta hace poco, el poder autodepurador de los cursos de aguas en la naturaleza era suficiente para restaurar y mantener el equilibrio acuático. Sin embargo las emisiones y vertidos incontrolados de núcleos industriales y humanos ha sobrepasado el poder autodepurador rompiéndose el ciclo hidrológico y afectando tanto a las aguas superficiales como a las subterráneas, que se utilizan entre otros muchos usos, para el consumo humano.

Los problemas graves de contaminación de las aguas surgieron hace aproximadamente doscientos años, con la Revolución Industrial y con un rápido aumento de la población mundial. El hombre abandonó el campo para trabajar en las nuevas fábricas, alrededor de las cuales se crearon grandes ciudades densamente pobladas (nucleos generadores de fuertes vertidos). Desde entonces, los esfuerzos para lograr la eliminación de los contaminantes generados por el hombre no han sido capaces de ajustarse ni al ritmo del incremento en la cantidad de desechos industriales, ni al crecimiento demográfico. Esto ha provocado a menudo la transformación de las aguas de lagos, ríos y costas en depósitos de residuos en los que el equilibrio natural está severamente perturbado y en muchos casos totalmente roto (Förstner y Wittmann 1981). Así ocurre en numerosos ríos de la zona centro y sur de la península ibérica, a lo cual además puede sumarse el grave problema de la sequía, que en los últimos tiempos está padeciendo esta zona, produciéndose daños irreparables para la salud humana y el medio ambiente (Aguiló, 1983; Cubillo, 1986; Florín y col.,1987).

La presencia de microcontaminantes orgánicos en el agua, muchos de los cuales son potencialmente tóxicos, mantienen una estrecha relación con los problemas sanitarios. Dichos problemas se manifiestan principalmente como enfermedades crónicas y/o de aparición a largo plazo en los seres humanos, y/o en enfermedades infecciosas causantes de la propagación de numerosas epidemias como el cólera etc.

Además con ellos se alteran las condiciones óptimas de los ecosistemas acuáticos. Los compuestos mutagénicos, carcinogénicos y teratogénicos, pueden llegar a constituir el 34% de los compuestos orgánicos identificados en el agua (Williamson, 1981), pudiendo aparecer como mezclas muy complejas, en las que en ocasiones se producen efectos antagónicos, sinérgicos ó aditivos, en los que intervienen un gran número de factores como temperatura, pH, concentración, radiaciones, etc.

En la actualidad se estima en más de un millón las sustancias diferentes que son introducidas en las aguas naturales a través de los vertidos antropogénicos. Muchas de ellas no son consideradas peligrosas, si bien pueden alterar las características organolépticas del agua, perturbar severamente el ecosistema y/o ser directamente nocivas para el hombre a corto o largo plazo.

De entre la gran diversidad de compuestos que pueden alterar los ecosistemas y causar daños al hombre nosotros nos ocuparemos principalmente de los efectos mutagénicos que puedan inducir el pool de compuestos y/o iones de polución del agua del río Tajo a su paso por la Comunidad Autónoma de Castilla-La Mancha que constituye el objeto de esta Tesis Doctoral.

La contaminación de las aguas fue definida en el artículo 85 de la actual Ley de Aguas del 2 de Agosto de 1985 (BOE 1985), como la acción y el efecto de introducir materia ó formas de energía, o inducir condiciones en el agua que de modo directo o indirecto, implican una alteración perjudicial de su calidad en relación con los usos posteriores o con su función ecológica.

Se pueden distinguir dos tipos de contaminación, la natural y la artificial o de origen antropogénico, la primera se origina por el simple contacto del agua con los terrenos por los que circula (procesos erosivos) y es difícilmente evitable, suele ser una contaminación difusa (no existen focos emisores concretos) (Andriano, 1986), la segunda se produce cuando el hombre perturba con sus actividades industriales, energéticas, agrícolas ó urbanas los ciclos hidrológicos, energéticos y biogeoquímicos

impidiendo la recuperación y el equilibrio entre ellos, debido al abuso constante y a la mala gestión tanto de los recursos hidráulicos como de los desechos o vertidos producidos por él, y este tipo de contaminación es puntual (Figura 1).

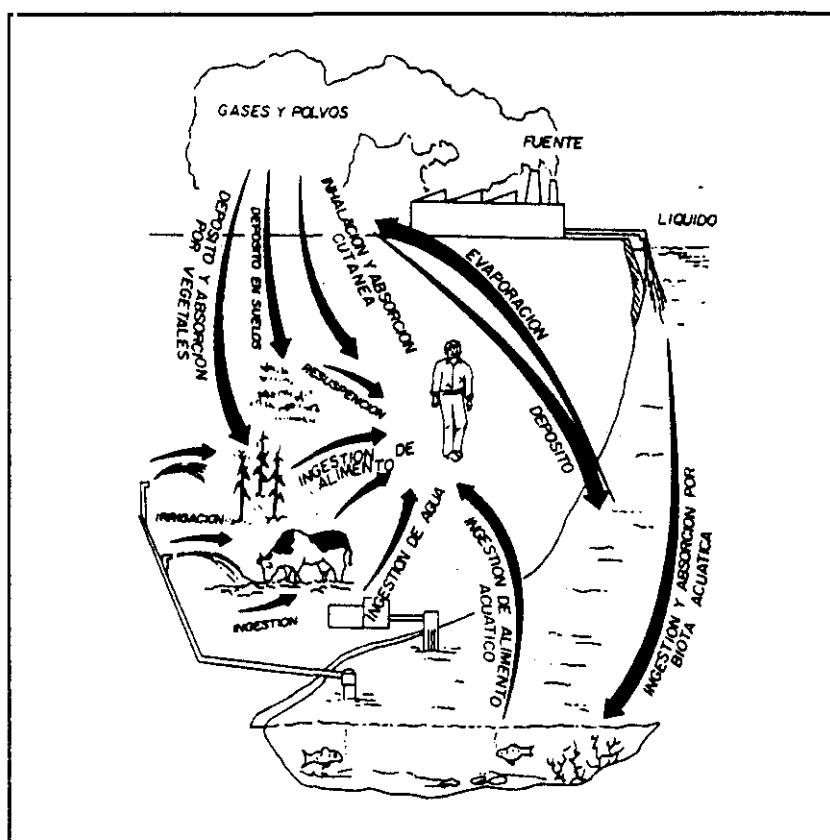


Figura 1. Representa el origen e intercambio de algunos xenobioticos en los diferentes sistemas ambientales y su relación con el hombre.

Otro concepto importante e indiscutible relacionado con la perturbación de los ciclos anteriormente mencionados es la interrelación e intercambio entre los diferentes componentes en ocasiones contaminantes de los compartimentos ambientales, debido al solapamiento que existe entre ellos (Figura. 2), siendo sistemas ecológicos totalmente diferentes con sus características, comportamientos, usos, peligros y efectos de las sustancias químicas, sobre cada uno de ellos.

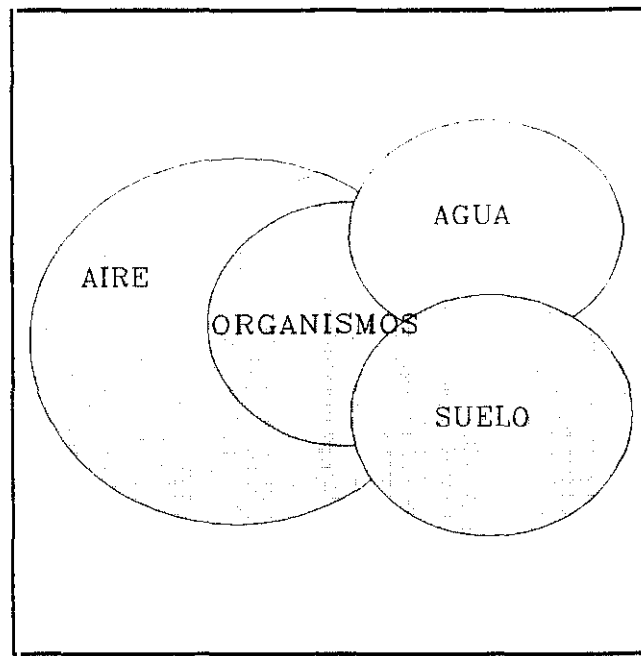


Figura 2. *Relación de solapamiento entre los diferentes compartimentos ambientales.*

Las sustancias contenidas en el agua, sea en disolución ó en suspensión se pueden agrupar según la concentración en la que se encuentra en macroconstituyentes y microconstituyentes. Entre los primeros se distinguen las sales inorgánicas muy solubles, el oxígeno, las partículas en suspensión y en general la materia orgánica considerada en bloque. Entre los microconstituyentes se incluyen aquellos que estando en concentraciones inferiores a los primeros son causa de contaminación por su toxicidad, su persistencia en el agua sin descomponerse o por ser susceptibles de bioacumulación en las cadenas tróficas.

Esta distinción entre los componentes del agua no es banal. Hasta hace pocos años la estimación de la calidad de las aguas para los diversos usos, se deducía con la simple consideración de los macroconstituyentes mas significativos (parámetros organolépticos, físico-químicos y microbiológicos). Actualmente los estudios de calidad de las aguas se realizan con criterios y procedimientos diferentes según se examinen unos u otros componentes ampliando el campo de estudio a otras áreas

como la toxicidad, carcinogenicidad, mutagenicidad etc. de los microconstituyentes del agua y su identificación.

Estos conocimientos son constantes y progresivos adaptando las leyes vigentes a los nuevos avances. Así la actual Directiva del Consejo Europeo (80/778/CEE), relativa a la calidad de las aguas destinadas al consumo humano, a la que España se ha adherido, incluye además de los parámetros anteriormente mencionados los relativos a las sustancias no deseables y a las sustancias tóxicas.

Esta claro que el desconocimiento de la existencia y del efecto que producían al hombre y al medio ambiente las sustancias consideradas como microconstituyentes eran parte importante del problema surgido a raíz de la existencia de residuos tóxicos y peligrosos a grandes concentraciones, los cuales hasta relativamente poco tiempo se liberaban al medio ambiente sin ningún tipo de control, incidiendo de alguna forma sobre el agua (superficial ó subterránea), debido a que esta es el medio de transporte universal.

Los residuos de origen antropogénico que aparecen en el ambiente acuático, aparte de la concentración en que se encuentran se pueden clasificar de formas diversas, nosotros los vamos a considerar: primero, de acuerdo al origen según la actividad ó uso del que proceden y segundo, por sus propiedades químicas, tiempos de permanencia en el agua, efectos que producen etc..

Según su origen los residuos pueden ser agropecuarios (fertilizantes, pesticidas, plaguicidas, abonos nitrogenados, etc.), sólidos urbanos, industriales, radioactivos y mineros, abarcando entre todos ellos un sin fin de actividades (químicas, papel y celulosa, transformados metálicos, refinerías, textiles, cuero, eléctrico, etc) debido a las cuales se generan por motivos diversos (monografías del MOPU 1989) sustancias y materias que por sus propiedades y efectos figuran en el anexo de la Ley Básica de Residuos Tóxicos y Peligrosos 20/1986 del 14 de Mayo (BOE 1986), de la que posteriormente hablaremos.

La clasificación según las propiedades y comportamiento de todas las sustancias químicas consideradas como residuos, una vez han sido eliminadas al medio ambiente alargaría mucho el capítulo, debido a la cantidad enorme de sustancias que hay y a las variables tanto físico-químicas como químico-dinámicas (transporte, movilidad, sedimentación, degradación, etc.) que influyen sobre cada una de ellas modificando sus efectos. Aquí nosotros nos limitaremos a nombrar algunos de los grupos de compuestos mas representativos con algunas de sus propiedades, indicando la existencia de monografías y libros donde se detallan estos procesos mas ampliamente (Peasson, 1979; Thibodeaux (1979); Casarett y Doull's (1986) y Garcia Puertas (1991)).

Pesticidas:

Independientemente de los riesgos tóxicos que entrañan cada uno de los grupos según su grado de biodegradabilidad, muchas de estas sustancias aún en bajas concentraciones, provocan modificaciones organolépticas del agua, que resultan inaceptables para el consumo y destruyen la flora y fauna acuática.

i) - persistentes, dentro de ellos citaremos:

a- **Insecticidas hidrocarbonados clorados:** (su grupo incluye DDT, TDE, etc.) su persistencia depende de los factores físico-químicos, son altamente solubles en lípidos y en la mayoría de disolventes orgánicos pero poco solubles en agua. Los procesos de degradación son relativamente escasos y debidos fundamentalmente a los microorganismos.

b- **Herbicidas catiónicos:** alta disolución y disociación en disoluciones acuosas, los procesos de adsorción se producen mediante reacciones de cambio de catión, son resistentes a la degradación microbiana y a la fotodescomposición y esto les hace persistentes indefinidamente, no son volátiles.

ii) - moderadamente persistentes:

a- **Herbicidas de triazina**: solubles en agua a pH bajo, los fenómenos de adsorción y volatilización dependen también del pH del medio, los fenómenos de hidrólisis y oxidación son sus principales rutas metabólicas, poca fotodescomposición.

b- **Herbicidas de fenilurea**: presentan distintas categorías de solubilidad en agua en función de la cual tienen distintos grados de movilidad en el suelo, no son muy volátiles, procesos de transformación por la mayoría de sistemas biológicos.

iii) - no persistentes:

a- **Herbicidas ácidos**: tienen un grupo funcional fenólico ó carboxílico, la movilidad de estos compuestos dependen de la materia orgánica.

b- **Herbicidas carbamylatos y fenilcarbamylatos**: bastantes solubles en agua, poco activos a la adsorción por parte de la materia orgánica del suelo.

c- **Piretroides sintéticos**: compuestos generalmente tóxicos a peces en bioensayos, sin embargo en condiciones de campo, los residuos incorporados al sedimento reducen la toxicidad.

d- **Organofosforados y carbamatos**: se degradan facilmente en el ambiente por mecanismos químicos ó fotoquímicos, sus productos residuales generalmente no son tóxicos siendo compuestos de bajo peso molecular, moléculas volátiles o facilmente degradadas o utilizadas por los microorganismos. Algunos de los organofosforados y carbamatos son relativamente solubles en aguas y suceptibles a hidrólisis, compuestos generalmente estables a pH ácido, sin embargo en condiciones alcalinas su hidrólisis es rápida, también aumenta con la temperatura. La persistencia de estos compuestos es función de su interacción con los minerales, también reaccionan con la materia orgánica.

Otros compuestoss orgánicos. no pesticidas: son compuestos que en ocasiones forman mezclas complejas como: **hidrocarburos policíclicos, dibenzodioxinas,**

cloruros, cianuros, colorantes, sustancias plastificantes, productos de la industria farmacéutica, complejos metalo-orgánicos, etc.. La mayoría de estos compuestos en numerosas ocasiones proceden de descargas municipales e industriales, de escurrientías urbanas y rurales, fuentes naturales y prácticas de purificación residual. Otros por el contrario, se encuentran en las aguas de bebida y se originan en los procesos de purificación mediante la cloración del agua entre los que destacan los trihalometanos y los ácidos carboxílicos halogenados (Johnson y col. 1982).

Hidrocarburos Policíclicos

Destacan por su toxicidad y carcinogenicidad los **policlorados bifenilos ó PCBs y los clorofenoles**. Su presencia está ligada a la degradación de los productos contenidos en las aguas residuales que proceden de vertidos muy diversos, saneamientos urbanos, afluentes industriales, así como en algunos herbicidas. Los **PCBs** son por ejemplo muy persistentes en el ambiente y lipofílicos, una propiedad que les confiere estabilidad y posibilidad de bioacumularse posibilitando efectos a largo plazo. Los **clorofenoles** se han utilizado mucho en la industria maderera y como agentes antibacterianos en numerosos productos. Se han encontrado en las aguas superficiales y en las aguas de bebida. Muchos de estos productos son resistentes a la biotransformación y persisten en el ambiente acumulándose en las cadenas alimentarias. Todas estas sustancias pueden disminuirse y en ocasiones incluso eliminarse mediante algunos tratamientos de depuración como la floculación, esterilización por compuestos clorados o por ozono, o filtración sobre carbón activo (García Puertas, 1991).

Hidrocarburos Halogenados de Bajo Peso Molecular

Los **trihalometanos** son el resultado de la cloración de una serie de precursores orgánicos comunes presentes en el agua pura, principalmente, las sustancias húmicas (National Research Council, Vol. 3, 1980). Esta mezcla de sustancias son fuertes carcinógenos (Kanarek y Young 1982; Cantor 1982 y

Crump y Guess 1980), relacionándolas también con efectos crónicos en hígado y en alteraciones de diversos sistemas enzimáticos (SGOT y SGPT) de este órgano Munsong y cols. 1982. Se ha comprobado que estas sustancias podrían disminuirse si se alteran los procesos de purificación del agua, así, la cloración se debería llevar a cabo a continuación de la eliminación de los materiales húmicos a través de los pasos de filtración y coagulación (Casarett y Doull's 1986)

Cianuros

Los ferrocianuros, tiocianatos, etc. y sus derivados presentan toxicidad muy fuerte, dependiendo de la concentración, pH y temperatura. Su estabilidad en agua es diferente dependiendo del complejo que formen.

Plastificantes de esteres del Ftalato

Se encuentran en industrias muy diversas: construcción, juguetes, empaquetamientos, automóviles, etc.. se encuentran muy distribuidos en el ambiente, agua, suelo, sedimentos, siendo poco solubles lo que les confiere poca movilidad. Estudios han confirmado su carcinogenicidad en ratas y ratones (Kluwe y col. 1983), así como varios efectos de toxicidad crónica (Conference on Phthalates 1982).

Detergentes

Son "agentes tensoactivos", disminuyen la tensión superficial de los líquidos en que se hallan disueltos. Los microorganismos pueden degradar estas sustancias dependiendo del grado de ramificación de la molécula (mayor ramificación, menor biodegradación). La formación de espumas y su estabilidad es mayor con la presencia de proteínas, partículas sólidas ó sales minerales disueltas, también influyen la temperatura y el pH. El problema fundamental de estas sustancias en el agua es que inhiben la oxidación química y biológica (DBO baja), impidiendo la autodepuración de los ríos. Por otra parte también la solubilidad del oxígeno en el agua disminuye impidiendo la

difusión del oxígeno del aire a través de la superficie del agua.

Metales pesados y sus derivados

Los metales traza se encuentran en las aguas naturales, o en las contaminadas como consecuencia del lavado de los terrenos que drenaron o procedentes de una contaminación. Tienen gran importancia en la química del agua debido al significado físico-químico y biológico que desempeñan. Pueden interaccionar fácilmente con la materia orgánica del agua, formando los compuestos metalo-orgánicos, que se acumulan en algunos organismos vivos y llegan a formar parte de la cadena alimentaria. Entre todos los existentes citaremos al cadmio, mercurio, plomo, arsénico y selenio, de los cuales existen numerosos estudios epidemiológicos que prueban sus efectos cancerígenos al hombre y sus efectos contaminantes al medio ambiente (el arsénico y el selenio no son metales, pero el término se utiliza también para incluir a estos metalóides).

Iones inorgánicos

Los nitratos, fosfatos y fluoruros han causado daños considerables al hombre y al medio ambiente.

Los **nitratos**: el hombre ha alterado el ciclo del nitrógeno, debido a la excesiva utilización del nitrógeno o derivados en prácticas agrícolas fundamentalmente en abonos. La problemática fundamental del ión nitrato reside en la alta solubilidad que presenta, lo cual implica lixiviados, fuerte difusión y movilidad ambiental en aguas y suelos. También hay presencia de nitratos en aguas de bebida. Pero el problema real reside en la conversión del nitrato o del ión amonio a nitrito, mediante una serie de microorganismos que se encuentran en el agua, suelos, residuos y tubo digestivo, pudiendo causar en los humanos enfermedades del tipo "metahemoglobinemia". Otro problema relacionado con estas sustancias, observado mas recientemente, es la producción de nitrosaminas en la comida, estas se producen mediante la reacción de los nitritos con las aminas secundarias, produciendo graves trastornos al hombre (hígado, pulmón, hemorragias etc.), por otra parte está demostrado el efecto

teratogénico que tienen en varios experimentos con animales. En general todos los compuestos N-nitrosos representan una clase muy importante de productos fuertemente carcinogénicos y mutagénicos tanto en animales como en el hombre (en estos últimos mediante la extrapolación de resultados) como prueban numerosos estudios, entre ellos, los revisados por nosotros en el apartado 3.3. de ésta introducción, en relación a la estructura química de ciertas sustancias y su capacidad para inducir procesos carcinogénicos y mutagénicos.

Los fosfatos: aunque el problema fundamental de estas sustancias no está relacionado directamente con la salud humana, sí afecta a la calidad del agua. Su presencia en las aguas proviene principalmente de los fertilizantes utilizados en la agricultura, así como de la mayoría de los detergentes. La presencia de fosfatos en cantidades excesivas en las aguas provoca los problemas de eutrofización en los lagos, dificultando enormemente los procesos de tratamiento del agua, necesarios para sus distintos usos (consumo, pesca, recreativos, etc.)

Fluoruros: Desde siempre se ha mantenido que cantidades pequeñas en las aguas de bebida, pueden ser beneficiosas para prevenir las caries dentales, sobre todo en los niños. Sin embargo se ha observado que la ingesta diaria de este ión en cantidades superiores a 2-80 mg, durante más de 10 años puede causar efectos tóxicos crónicos del tipo "fluorosis dental" (manchas en los dientes) y "fluorosis del esqueleto" (parálisis) (National Research Council Vol. 3, 1980).

Por último, existen otra serie de procesos que pueden alterar las condiciones de vida de la fauna y flora de los ecosistemas, nos estamos refiriendo, a las aguas procedentes de la refrigeración de las centrales nucleares, térmicas etc. las cuales modifican la temperatura del agua.

Cuando se trata de estudiar las mezclas complejas de múltiples compuestos químicos, hay que considerar distintos factores como: el efecto de unión de dos ó más productos químicos; los efectos múltiples sobre la salud, y los coeficientes de conversión interespecies existentes. Este último factor permite en algunos casos y de forma indirecta predecir los efectos sobre la salud en los humanos a partir de estudios realizados en otras especies ya sean de corta ó de larga duración (Varma y col. 1988).

A raíz de la Ley Básica de Residuos Tóxicos y Peligrosos del 14 de Mayo (BOE 1986), en la que se incluyen gran parte de las sustancias pertenecientes a estos grupos descritos surge el desarrollo de la misma con el Real Decreto 833/1983, de 20 de Julio (BOE 1988a), en el que se aprueba el reglamento para la ejecución de la citada ley determinando posteriormente los métodos de caracterización de residuos (BOE 1989) en función de su toxicidad y peligrosidad e identificándolos en orden a su inflamabilidad, explosividad, comburencia, irritación y corrosión, toxicidad aguda, subcrónica y crónica, mutagenicidad, teratogenicidad, carcinogenicidad, infectividad, reactividad generada de gases tóxicos, ecotoxicidad y transformaciones abióticas susceptibles de generar sustancias con alguna de las capacidades anteriormente citadas independientemente y ajustándose siempre al Real Decreto 2216/1985 (BOE 1985) por el que se aprueba el reglamento sobre declaración de sustancias nuevas, clasificación, envasado y etiquetado de sustancias peligrosas (de la Fuente y Frutos 1995).

Del cumplimiento de estas leyes relacionadas con los residuos y los vertidos y de otras relacionadas con actividades en las que aparecen también sustancias de nueva creación ó existentes en el mercado (Figura 3) surge debido al uso constante, la creciente necesidad de averiguar sus efectos sobre las personas, organismos aislados ó medio ambiente, identificándolas y clasificándolas. Es en este punto donde los organismos competentes nacionales e internacionales establecen criterios sobre los ensayos que se exige llevar a cabo para poder determinar la inocuidad ó toxicidad de las sustancias químicas.

En algunas normativas aparecen como primera etapa de estudio ensayos de

genotoxicidad con bacterias entre los cuales se encuentra el Test de Ames, ensayo desarrollado en este trabajo.

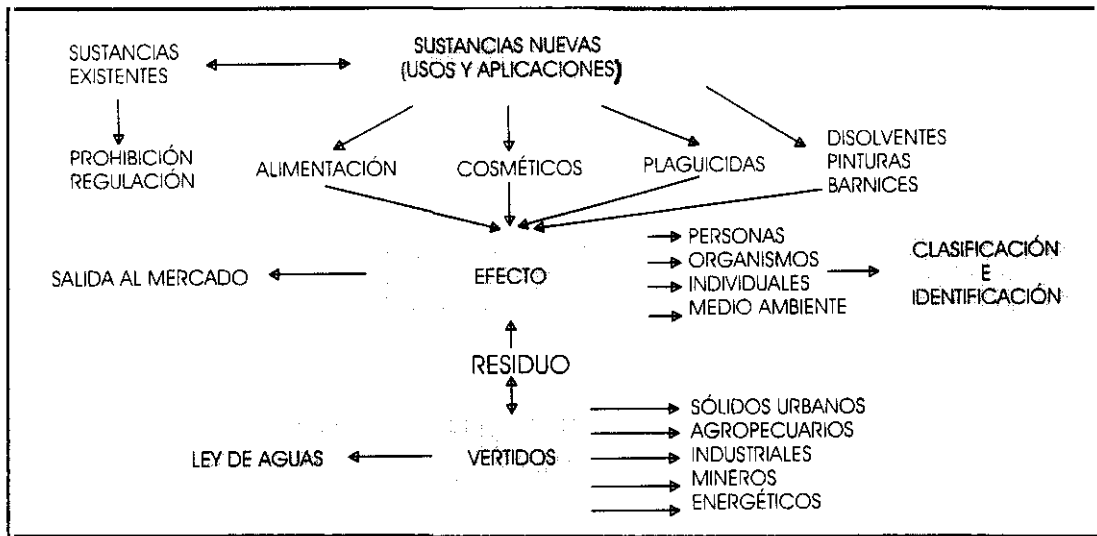


Figura 3. *Relación entre sustancias de origen diverso y sus efecto al hombre y medio ambiente.*

1.1. Tóxicos ambientales: categorías, características, factores.

Los tóxicos ambientales comprenden un gran número de sustancias con diversas estructuras químicas y se dividen fundamentalmente en 2 categorías muy amplias:

- i) metales pesados y sus compuestos
- ii) sustancia orgánicas

A pesar de que estas sustancias químicas tengan estructuras muy diversas, muchas de ellas poseen una serie de propiedades físicas o características que las hacen potencialmente tóxicas (Förstner y Prossi 1979; Förstner y Wittmann 1981):

- persistencia en el ambiente (muchas de ellas como en el caso de los metales no son biodegradables)
- tendencia a formar asociaciones entre si formando complejos metalo-orgánicos, mediante diversos tipos de reacciones químicas (precipitación, intercambio iónico, adsorción, quelación etc.)

- progresiva acumulación a lo largo de la cadena alimentaria
- toxicidad creciente en el hombre.

La fuente origen y la incidencia ó efecto de estas sustancias en los medios ambientales, difiere con respecto a la categoría del contaminante. Así por ejemplo la contaminación del ambiente y de los organismos de la biota por complejos de sustancias orgánicas, es debido fundamentalmente a la actividad humana (PCBs en el pescado, etc.). En el caso de los metales pesados y sus compuestos, la actividad humana juega un papel bastante más reducido, excepto en casos de contaminación abundante, como por ejemplo: vertidos importantes a base de mercurio, plomo etc. Además los metales pesados y sus compuestos tienen capacidad de intercambio entre las fases sólida y líquida de los sistemas acuáticos, debido tanto a variaciones de los componentes bióticos como abióticos, lo que hace que los sedimentos no sean compartimentos estanco de metales. Estos elementos pueden resolubilizarse por distintos procedimientos y así (generalmente en formas químicas diferentes) son directamente incorporados por el hombre, o bien indirectamente llegan hasta él a través de la cadena trófica.

Las manifestaciones tóxicas producidas en los organismos vivos por cualquier producto tóxico pueden ser:

- i) agudas, rápidas y claramente definidas, a veces fatales;
- ii) crónicas cuando aparecen los síntomas tras prolongadas exposiciones a dosis bajas del tóxico, o mucho tiempo después de la interacción con él, produciendo daños graves, incluso letales.

La tendencia de los tóxicos a concentrarse en determinadas zonas de los distintos ecosistemas ó incluso en determinados órganos concretos en los animales es selectiva y limitada.

Sin embargo el efecto o grado de toxicidad que se produce en el ambiente en general incluyendo el ser humano puede ser muy diverso, dependiendo de un sin fin de factores que si bien están muy interrelacionados, se han clasificado en dos grandes

grupos:

i)- factores abióticos

ii)- factores bióticos

Factores abióticos

Para clarificar la exposición vamos a dividir a su vez estos factores en dos subgrupos: i)- factores inherentes a la propia sustancia, entre los que se encuentra la naturaleza de la sustancia, la concentración en la que se encuentra en el medio, la disponibilidad en la que se encuentra en el sistema, su estado molecular específico (especiación) y el tiempo de permanencia, y ii)- factores físico-químicos ambientales, como el pH, temperatura, Eh ó potencial de óxido-reducción, cantidad de materia orgánica presente en el medio, oxígeno disuelto, presencia de iones inorgánicos (tanto aniones, como cationes, densidad, turbidez, presencia ó ausencia de coloides, luz solar, etc.

Todos los factores inherentes del tóxico pueden modificarse, tanto por los elementos bióticos, como por la acción de los factores abióticos (Hahne y Kroontje, 1973; Bryan, 1976; Poddubnaya, 1980; Stunn y Morgan, 1981; Babich y Stotzky, 1983a, 1983b, 1983c, 1985; Murphy Jr. y Spiegel, 1983; Winner, 1984, 1985, 1986; Wood 1987, 1989).

Respecto de los factores inherentes a la propia naturaleza del producto, cualquier producto tóxico o no tóxico al estar sometido a diferentes condiciones ambientales y en contacto con otras sustancias, podrá sufrir o mostrar diversas configuraciones moleculares. Las diferentes especies moleculares que presenta el producto podrán tener distinto grado de bioasimilación y toxicidad (Freedman y col., 1980; Stunn y Morgan, 1981; Babich y Stotzky, 1983b; Benés y col. 1985; Brümmer, 1986).

Otro factor importante que influye sobre la toxicidad del producto es el tiempo

de persistencia en el sistema, dato de muy difícil determinación, que puede llegar a ser en los metales fundamentalmente, de muchos años, si las condiciones y la estabilidad del medio son favorables (Wangersky, 1986). Dentro de los compuestos orgánicos también hay sustancias como pesticidas, hidrocarburos policíclicos, etc., cuya permanencia en el sistema puede ser elevada (Casarett y Doull's. 1986) dependiendo del momento y proceso de transformación posterior que sufra la molécula.

En lo relativo a los factores físico-químico ambientales, también su efecto combinado puede tener gran influencia sobre el grado de toxicidad y sobre la incorporación ó bioasimilación de los diversos productos por parte de los organismos acuáticos (Prosi, 1981). A continuación se comentan algunas de las influencias de los parámetros físico-químicos sobre diversos parámetros ambientales:

El pH afecta a la estructura química de los productos modificando su movilidad en el medio (Wood, 1989; Babich y Stotzky, 1983b). El pH además influye en las interacciones de los compuestos (orgánicos e inorgánicos) con otros parámetros físico-químicos como la dureza del agua (principalmente carbonatos) en los procesos de coagulación, o en las reacciones con otros compuestos ya sean orgánicos ó inorgánicos (tanto aniones como cationes), aumentando ó disminuyendo según los casos la toxicidad del producto (Prosi, 1981; Babich y Stotzky 1985; y Stahl, 1991).

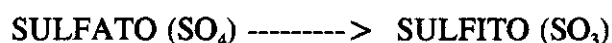
Así por ejemplo hay estudios suficientes que prueban que la cloración de las aguas naturales, residuales ó de bebida por motivos diversos (desinfección de las aguas naturales, vertidos de diversa índole como es el proceso de blanqueo de la materia prima en las fábricas de papel con lejía) incrementa su genotoxicidad (Rapson y col. 1980; Carlberg y col. 1980, 1986; Stahl, 1991).

Durante la cloración las partículas orgánicas de peso molecular alto resultan degradadas a otras de peso molecular menor, las cuales parecen ser las que producirían genotoxicidad de acción directa (Becher y col. 1985). Por otro lado hay existencia de

otros estudios que muestran que en ocasiones no hay relación entre el incremento de la genotoxicidad y la cloración de las aguas residuales (Neal y col, 1981). Esto tiene su explicación clara en la importancia de los componentes integrantes de las diferentes aguas (aminoácidos, ácido húmicos, aminos aromáticas, fenoles, hidrocarburos etc.) y por tanto en los distintos tipos de reacciones químicas que se pueden producir (Kopfler y col. 1984; Kringstad y col 1985; Rav-acha y Blits, 1985; Stahl, 1991).

Las variaciones de pH también afectan a los organismos vivos de la biota acuática, modificando sus membranas plasmáticas y provocando variaciones en la bioasimilación de los diferentes compuestos (Muller, 1980; Nasu y col., 1983 y Babich y Stotzky, 1985).

El Eh o potencial de óxido-reducción, el conocimiento de este factor ambiental en los distintos medios: agua, suelo, etc., nos indica el grado de contaminación que posee el medio en cuestión (Pesson 1979), además el grado de aerobiosis (condiciones oxidantes) ó de anaerobiosis (condiciones reductoras) del medio es importante porque favorecen una serie de transformaciones microbianas, las cuales provocan reacciones de precipitación de ciertos metales (Babich y Stotzky, 1983b; 1985; Rovira, 1993).



Este proceso ocurre con frecuencia en los cursos bajos de ciertos ríos españoles como por ejemplo, en el río Jarama en que las condiciones reductoras y las características geomorfológicas del terreno permiten la abundancia de sulfatos (Catalán, 1981 y Catalán y Catalán, 1987). De aquí se desprende el interés de los procesos de oxido-reducción en el estudio de los lodos y en los tratamientos de las aguas en los procesos de depuración.

Por otra parte el potencial red-ox del ambiente está relacionado con la especiación metálica ó valencia de algunos metales pesados. De esta forma un mismo elemento como por ejemplo el "cromo" en zonas oxigenadas de ciertas aguas se

encuentra en la forma estable " Cr^{6+} ", mientras que en las zonas carentes de oxígeno el cromo se reduce a " Cr^{3+} ", que a pH neutro o suavemente alcalino se deposita en forma de óxido (Cranston y Murray, 1978). El intercambio de valencia de un metal que dependen de una serie de factores como son el potencial de oxido-reducción, del lugar de unión del metal con otras moléculas de materia orgánica (James y Bartlett, 1983 a y b) o de la presencia o ausencia de partículas coloides presentes en el medio (James y Bartlett, 1983b), pueden provocar distintas toxicidades y diferentes grados de bioasimilación en los organismos vivos (Babich y Stotzky, 1983b, 1985 y Wood, 1989).

El contenido en materia orgánica en las aguas residuales es muy variado en su estructura molecular, ya sean las formas solubles o las particuladas, y pueden alterar la distribución de otras sustancias favoreciendo ciertas reacciones. Así por ejemplo en la mayoría de los metales se produce disminución de sus niveles en la forma disuelta y aumento de la concentración en la forma coloidal, en suspensión (pudiéndose incorporarse de esta forma a la cadena trófica), o en los sedimentos (Rovira 1993). La mayor ó menor presencia de materia orgánica en el agua está relacionado con el balance de oxígeno en el agua, el cual se establece entre las actividades consumidoras (descomposición de la materia orgánica presente en el agua, respiración de los organismos acuáticos) y las aportaciones (reaireación y fotosíntesis) (Pesson 1979).

Los iones inorgánicos presentes en el agua, tanto aniones como cationes, también influyen en la toxicidad de las aguas, así por ejemplo resultan tóxicos la formación de sulfuros de hidrógeno (en condiciones anaerobias) o la de carbonatos insolubles (Prosi 1981). Esto sucede fundamentalmente cuando se produce la mezcla de aguas de diferentes orígenes, como son los vertidos residuales realizados en cursos fluviales naturales o las aguas de ríos de distintas características físico-químicas (Catalán, 1981).

La temperatura va a influir sobre la solubilidad de los diferentes tipos de

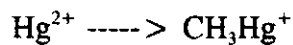
compuestos y sobre su velocidad de reacción al igual que el contenido en oxígeno va a afectar de forma decisiva tanto a la distribución como al estado fisiológico de la biota del ecosistema del que va a depender la respuesta frente al tóxico (Rovira 1993). La descomposición de la materia orgánica presente en el agua experimenta una aceleración por efecto del incremento de temperatura. Así por ejemplo un vertido de agua caliente en un río ya contaminado por materia orgánica agrava, por tanto, el déficit de oxígeno producido por esta polución, al tiempo que disminuyen los mecanismos de autodepuración del agua (Pesson 1979).

Factores bióticos.

Junto a lo dicho en el apartado anterior, la presencia de las sustancias tóxicas en los sistemas acuáticos está condicionada por: a) el grado de bioasimilación y por los mecanismos de defensa que utilizan los organismos blanco frente a los tóxicos en general, y b) por la acción que la propia biota puede ejercer sobre su especiación química (Murphy y Spiegel, 1982 y 1983; Wood, 1987 y 1989).

Tanto en Procariotas como en Eucariotas, la incorporación de los elementos traza esenciales está firmemente relacionada con los promedios de reciclaje de los elementos mayoritarios (C, H, N, O, P y S). Estos mecanismos bioquímicos, implicados en el transporte de todos los elementos esenciales para la vida, están fielmente regulados a nivel genético. Las células tienen que invertir energía no solo para el mantenimiento de la homeostasis de los elementos esenciales, sino para preservar el citoplasma celular de los tóxicos indeseables (mecanismos de detoxificación). Los mecanismos para conseguir la homeostásis y excluir dichos tóxicos incluyen: precipitación, formación de complejos con ligandos orgánicos, volatilización, alquilación, hidrólisis, oxidación reducción y mecanismos de expulsión (transporte) dependientes de energía (canales de exclusión dependientes de ATP y exocitosis de vesículas lisosomales secundarias) (Higgins y Burn, 1975; Matisoff y col. 1985 y Wood, 1989). Un ejemplo claro de estos mecanismos puede ser la opinión de Bindra y Hall, (1978) que sugieren que los tubificidos pueden regular la concentración de iones metálicos de sus tejidos.

Por el contrario, por estos mismos mecanismos ó transformaciones ó incluso por cambios promovidos por la propia microflora del individuo a veces un compuesto no tóxico en su origen se transforma en otro distinto final con propiedades tóxicas (posibles mutágenos/carcinógenos). Es el caso del mercurio inorgánico el cual se convierte en metil y dimetil mercurio en el medio acuoso debido a la influencia de bacterias y hongos:



El proceso de metilación se puede verificar en condiciones anaeróbicas (p. ej., Clostridium) o aeróbicas (p. ej. Neurospora, Pseudomonas) (Mason, 1984). Otro ejemplo de reacción bioquímica que se metaboliza en el intestino humano por la acción de la propia microflora son los colorantes del grupo "azo".

En definitiva la actividad metabólica de los microorganismos (incluso la propia microflora de cada individuo) juega un papel significativo en la movilidad de los elementos tóxicos en el medio ambiente (Wood, 1989).

2. GENOTOXICIDAD

Al igual que existe diferencia entre la palabra toxicidad y la palabra toxicología, la primera apunta a las propiedades específicas a la naturaleza de las sustancias químicas y la segunda se refiere al estudio de las diversas propiedades no deseables que se pueden encontrar en ellas, existen también diferencia entre lo que se entiende por toxicología tradicional y la toxicología moderna. De manera general, la primera puso y pone énfasis en las observaciones cualitativas de los efectos nocivos observados en hombres, animales y plantas por ciertas sustancias naturales, en cuanto que la segunda enfoca los aspectos cuantitativos de las causas y de los efectos (Repetto y Vettorazzi, 1983; Repetto, 1995).

La toxicología genética, una de las diversas ramas de aplicación de la toxicología moderna es una ciencia relativamente reciente y en auge, que se ocupa de

detectar sustancias y procesos físicos capaces de modificar el material genético y en cuantificar su posible riesgo para el hombre. Con el desarrollo de la toxicología genética han aparecido nuevos conceptos como potencial genotóxico y genotoxicidad.

Potencial genotóxico ó potencial carcinogénico son términos utilizados para indicar la posible capacidad que tienen determinados productos químicos en desarrollar un proceso mutagénico ó carcinogénico y la genotoxicidad como su propio nombre indica es la "toxicidad en el genoma". La medida del "daño genético" sobre un organismo es el objeto de los estudios de genotoxicidad.

Los procesos genotóxicos ocurren cuando determinados productos químicos, o en ocasiones procesos físicos, generan efectos tóxicos que alcanzan la molécula del material hereditario. Como consecuencia de dichos efectos tóxicos aparecen procesos de mutagénesis, carcinogénesis, teratogénesis, retraso celular, inducción de fagos en las bacterias, roturas cromosómicas etc., siendo estos en ocasiones de naturaleza irreversible (Hofnung y Quillardet 1986).

La detección y cuantificación de cada uno de estos efectos tóxicos se utilizan como indicadores de la genotoxicidad de un determinado compuesto. La situación ideal es aquella en la que el compuesto, ha sido clasificado en el mismo nivel de genotoxicidad utilizando técnicas distintas (Quillardet y col. 1985).

La mutagénesis como indicador de genotoxicidad, estudia las mutaciones en relación con su origen, transmisión y detección. Consecuentemente, los mutágenos son los agentes físicos ó químicos capaces de inducir, directa o indirectamente, mutaciones (Velazquez, 1987).

El genoma es el conjunto de información genética necesaria para el desarrollo total y funcionamiento pleno del ser vivo. Dicha información está codificada en las moléculas de ADN. Estas moléculas están constituidas por integración de estructuras físicas denominadas cromosomas. Todos los componentes básicos del DNA (bases

nitrogenadas, azúcares y grupos fosfodiésteres) son posibles blancos de las lesiones químicas. Especialmente peligrosas son las lesiones que afectan a las bases nitrogenadas, por ser éstas los elementos fundamentales de información del código genético. Muchos de estos tipos de lesiones han sido perfectamente caracterizadas como alquilaciones, acilaciones, interacciones cruzadas DNA-DNA, interacciones DNA-Proteínas, etc. e incluso se conoce su posible mecanismo de reparación, proceso en el cual frecuentemente se produce también mutaciones (Friedberg, 1985).

En razón a la metodología que se ha desarrollado y homologado por la CEE, OCDE y otros organismos internacionales (EPA), se puede clasificar el amplio espectro de aspectos genotóxicos como:

- Mutagénesis puntual
- Roturas y aberraciones cromosómicas
- Daño o fragmentación del DNA

La mutagénesis puntual o intragénica es la base de nuestro estudio, a la cual nos limitaremos, y consiste en la sustitución de la secuencia de uno o varios pares de bases mediante delección o adición con el resultado de que la información genética original es cambiada alterándose la expresión del gen, originando un individuo mutante.

La expresión del gen mutado origina una proteína alterada. La estabilidad de las moléculas hereditarias, que parecería ser un requisito necesario para hacer frente a su papel biológico, es sin embargo relativa. Las mutaciones son en su inmensa mayoría perjudiciales para el individuo que las sufre y, solo unas pocas son beneficiosas y presumiblemente permiten la evolución de las especies, apareciendo espontáneamente con una frecuencia relativamente baja (Miller y Miller, 1981). El gran despliegue de formas biológicas que existen y han existido, y la variabilidad y diversidad de formas de vida originadas a partir del primer ser vivo, han surgido gracias a la aparición de errores sistemáticos que han permitido una diversificación de las moléculas hereditarias autoduplicables (Auerbach y Kilbey, 1971; de la Fuente y

Frutos (1995).

Conviene distinguir las mutaciones espontáneas que tienen lugar ocasionalmente en la naturaleza, de las mutaciones inducidas que son producidas por el efecto de numerosos agentes inductores físicos (v.g. radiaciones uva, interacciones electromagnéticas (García-Sagredo y Monteagudo, 1991)) y químicos de los que se ocupa esta Tesis Doctoral. Los mecanismos moleculares productores del cambio de la secuencia de bases pueden ser muy diferentes según los casos, provocando a su vez varios tipos de lesiones, como hemos mencionado anteriormente.

Las mutaciones inducidas directa ó indirectamente cuando afectan a las células germinales, el resultado es transmitido a la descendencia, produciéndose un daño genético hereditario y acumulativo sobre la progenie del individuo afectado (mutación germinal). Si por el contrario la mutación afecta a las células somáticas del individuo, esta se transmite de una generación celular a otra (mutación somática).

Los mutágenos normalmente no inducen un único tipo de cambio pudiendo depender las mutaciones de varios tipos de factores como intrínsecos al individuo, dependientes del medio ambiente, derivados de las condiciones de administración o absorción del agente etc.. Por otro lado los procesos de reparación de los diferentes tipos de lesiones producidas dependerán también del estado genético y fisiológico de las células como sexo, edad, salud o enfermedad, nutrición y dieta, temperatura etc.. de la Fuente y Frutos, (1995).

La utilización de los ensayos de mutagenicidad ha permitido identificar gran número de procarcinógenos y carcinógenos directos. De esta forma el interés por estos ensayos ha ido aumentando y en la actualidad son considerados como los mecanismos predictivos para la búsqueda de carcinógenos potenciales (Brusick, 1988).

Al ser considerada la carcinogenicidad considerada en muchas ocasiones como consecuencia propia directa de la genotoxicidad, y ambas a su vez como consecuencia

de un proceso de toxicidad general, es importante determinar la capacidad genotóxica de un compuesto químico para inducir un cierto daño genético. Como lo es también, el considerar otros mecanismos básicos de la toxicología (absorción, metabolismo y otro tipo de manifestaciones tóxicas existentes no genéticas, (Auletta, 1990).

A través del tiempo y mediante estudios epidemiológicos se ha podido establecer un paralelismo entre diversos aspectos de la mutagénesis y de la carcinogénesis, estimándose que aproximadamente el 70% de los cánceres en el hombre podrían ser prevenidos si el factor de riesgo principal pudiera ser identificado (Doll y Peto, 1981).

Numerosos trabajos confirman que en la mayoría de los procesos cancerígenos intervienen mutaciones somáticas, transformando células normales en células malignas y ello puede ser inducido por la presencia de tóxicos. En consecuencia en toxicología genética la capacidad de un agente químico o físico para producir mutaciones interesa, tanto en relación a las mutaciones hereditarias (mutaciones de las líneas de células germinales), como en lo referente a los procesos cancerígenos (mutaciones de la línea celular somática) (OPS/OMS, 1980; de la Fuente y Frutos, 1995).

En cuanto al mecanismo por el cual se induce el cáncer, muchos autores han observado que en el genoma de las células malignas existen malformaciones que no aparecen en las células normales. En el momento actual no se sabe, cuáles son los factores que provocan estas modificaciones (aunque podrían ser de naturaleza diversa) y cual el mecanismo molecular exacto que hace que la célula se transforme en "neoplásia" (Doll y Peto, 1981).

Sin embargo lo que parece claro, es que la malignidad de ciertos neoplasmas es principalmente atribuible a trastornos de la expresión genética. En particular, se advierte en los tumores ciertos genes que no debían haberse expresado; activarse por causa de modificaciones genéticas hereditarias que conciernen a las células somáticas (OCDE, 1986). En la Figura 4, se observa el desarrollo de un proceso cancerígeno,

mediante un fenómeno mutagénico. La sustancia química penetra en la célula en forma reactiva (mas frecuentemente en contaminantes ambientales) ó se activa en la propia célula mediante procesos enzimáticos. Los compuestos con capacidad de reaccionar son a menudo compuestos electrofílicos y reaccionan (fundamentalmente mediante procesos de oxidación bioquímica o de hidroxilación) con macromoléculas nucleofílicas, especialmente con las proteínas y los ácidos nucleicos de la célula (Stumm y Morgan, 1981).

Los genes cuya expresión patológica entra en juego en el curso de la carcinogénesis se denominan oncogenes y derivan por diversos mecanismos de genes celulares normales, los protooncogenes (Santos y Villanueva, 1985). La activación de estos oncogenes parece que puede ocurrir a traves de mecanismos genéticos diversos e irreversibles, entre otros (Bishop, 1985):

- mutación puntual, modificándose un único par de bases del DNA y alterando la secuencia de la proteína correspondiente.
- mediante una mutación ligada a la amplificación de un gen, resultando de ella una sobreproducción del producto
- y por último mutaciones aparecidas como consecuencia de reajustes del DNA y de los cromosomas.

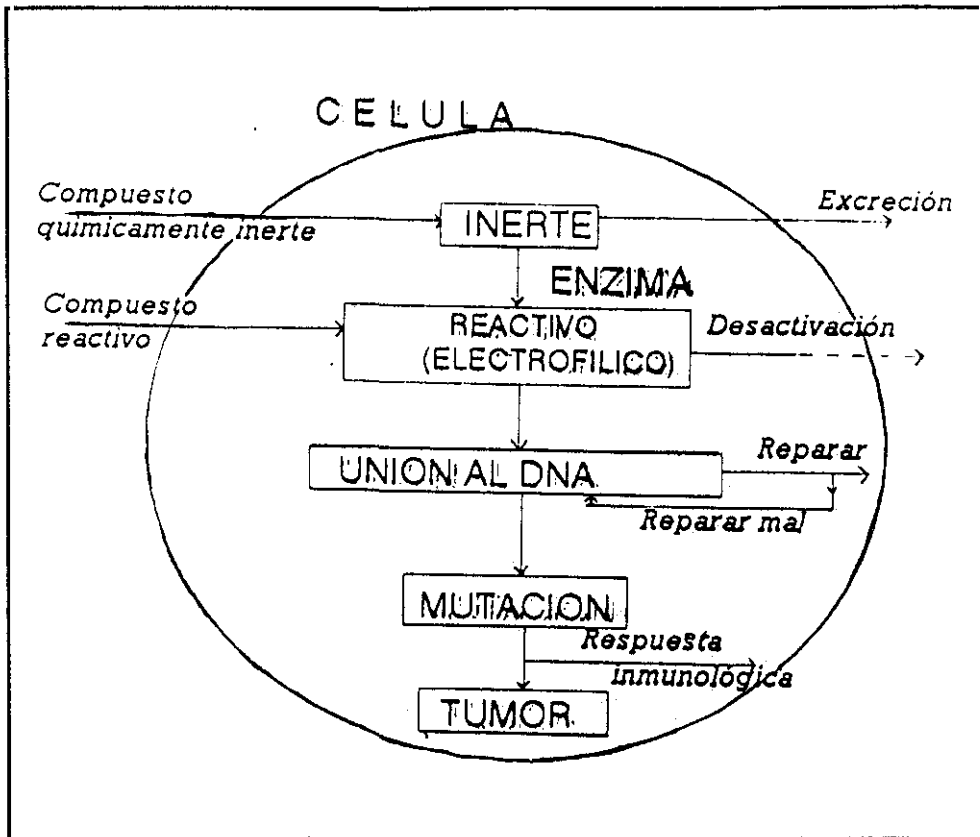


Figura 4. Inducción de un efecto carcinógeno mediante una mutación. La mutación puede producirse tras la interacción química de una sustancia reactiva (a menudo electrofílica) como el ácido desoxiribonucleico (o el ácido ribonucleico). {Modificado por Lutz, W.K.; 1990}.

Es interesante indicar que, numerosos procesos cancerígenos están ligados a anormalidades de los cromosomas, de las cuales, las mas frecuentes son las deleciones, translocaciones recíprocas y la variación del número de cromosomas (Yunis, 1983).

Además en la activación de los oncogenes pueden existir otros mecanismos distintos de los originados por los carcinógenos químicos.

A la hora de evaluar el riesgo potencial de un producto químico sobre el hombre se presenta uno de los principales problemas de la toxicología genética, el interpolar los resultados obtenidos en los ensayos de mutagénesis realizados en

sistemas de organismos evolutivamente inferiores al hombre. El realizar extrapolaciones de los resultados de ensayos de mutagénesis de un organismo a otro requiere, por lo menos, considerar dos factores principales: el mecanismo de respuesta celular propio de cada organismo, una vez el DNA ha sido dañado y las diferencias de metabolismo existentes entre los distintos componentes celulares (Hofnung y Quillardet, 1986).

3. VALORACION DEL RIESGO GENOTOXICO

3.1. Correlación Carcinogenicidad/Mutagenicidad

Al hablar de productos genotóxicos, nos estamos refiriendo en la mayoría de los casos a posibles sustancias que son también carcinogénicas.

Desde hace tiempo hay datos y pruebas suficientes de la alta correlación que hay entre la actividad mutagénica y el potencial carcinogénico de muchos productos químicos, de esta forma resulta favorecido el desarrollo y la optimización de los ensayos de genotoxicidad (MacCann y col. 1975 y Bartsch y col.1980).

La correlación carcinogenicidad/mutagenicidad ha ido variando con el tiempo, al haber aumentado el número de datos disponibles sobre los distintos productos en los diferentes tipos de ensayos.

Es bien conocida la incertidumbre que existe sobre la extrapolación de los datos de carcinógenos animales al hombre, como hemos comentado en el apartado anterior. En general se puede decir que las sustancias químicas que son carcinógenas para una especie lo son también para otras, aunque la potencia cancerígena, varía considerablemente dependiendo de la especie animal en la que se ensaya, la vía de administración usada y de la forma química empleada, entre otros factores. El IARC ha venido publicando anualmente en sus monografías, los resultados existentes sobre

mutagenicidad de productos químicos, obtenidos en diversos laboratorios (IARC, 1980-1991).

Por otro lado, clasificar una sustancia como no carcinógena, también entraña dificultades. Se exige el uso de un test de duración adecuada, en al menos dos especies animales, a varios niveles de dosis y los controles positivos utilizados deben ser del mismo grupo químico que el agente a ensayar.

La más extensa validación de los ensayos bacterianos, fué realizada por Ames y McCann (1975); McCann y Ames (1976), quienes llevaron a cabo un estudio en el que se incluyeron más de 300 productos químicos nuevos, que habían sido probados previamente en animales para ver su poder carcinógeno, o bien que ya eran conocidos carcinógenos en humanos. En éste estudio, en el que se utilizó el test de Ames, se obtuvo una sensibilidad del 90% (157/175) y una especificidad del 87% (94/108). En el mismo estudio, también se reseñó que el 10% (18/175) de los carcinógenos investigados eran no mutágenos o falsos positivos, comprobándose más tarde que muchos de ellos producían metabolitos, que sí resultaban positivos en el test de Ames. Por otro lado, 13% (14/108) de los no carcinógenos fueron falsos positivos, al mostrar algún grado de mutagenicidad en el test.

Purchase y cols. en 1982, seleccionaron cuidadosamente 120 productos químicos y los investigaron en una serie de tests a corto plazo. El análisis de éstos y otros estudios han mostrado que el éxito de los test bacterianos para detectar carcinógenos, está influido por el tipo ó la clase de agente químico que se estudia y por los criterios bajo los cuales se juzga la actividad carcinogénica en los animales.

En España, se ha realizado también la evaluación de la carcinogenicidad y mutagenicidad en un elevado número de plagicidas utilizando los ensayos de corta duración, obteniéndose una sensibilidad del 73%, una especificidad del 55% y un valor predictivo del 72% (Herrera y de la Peña, 1989 y 1991).

Pero el más ambicioso ejercicio de validación de éstos tests realizados hasta la fecha, ha sido el Programa Internacional para la Evaluación de Test de Mutagenicidad a corto plazo (de Serres y Ashby, 1981), en el que participaron más de 50 laboratorios y en el cual se evaluaron más de treinta ensayos "in vivo" e "in vitro", con el fin de determinar su capacidad para discernir entre compuestos carcinógenos y no carcinógenos.

Se llegó a la conclusión de que los ensayos son válidos en su mayoría, proporcionando resultados fidedignos en gran número de laboratorios, y se han confirmado como la primera opción a la hora de iniciar un estudio de evaluación de un nuevo producto.

3.2. Riesgo Genotóxico

El descubrimiento de que muchos de los agentes físicos/químicos, naturales ó sintéticos, tienen un potencial mutagénico/carcinogénico para el hombre y produzcan efectos irreversibles sobre el medio ambiente (Claxton y cols. 1988; Suzuki y cols. 1990; Cova y cols. 1990 y Omura y cols. 1991), ha despertado un gran interés por parte de numerosos organismos oficiales en detectar, determinar y evaluar el posible riesgo que entrañan los distintos agentes que nos rodean.

Un gran número de estudios epidemiológicos, de índole diversa (geográficas, laborales, dietéticas etc), confirman la incidencia del cáncer en el hombre, causada de forma directa o indirecta por factores ambientales (Formi y col. 1987).

Además por otra parte los estudios epidemiológicos a largo plazo apoyan, los resultados obtenidos en los estudios experimentales, en animales, y son indicativos de la eficacia de las medidas adoptadas en la prevención, cuando se sabe de la existencia de un posible riesgo.

Los ensayos de experimentación animal pueden ser utilizados para identificar

cancerígenos potenciales para el hombre, pero dada su larga duración, complejidad y costo, no pueden abarcar la enorme cantidad de productos nuevos que se generan en la actualidad. Debido a ello , deben ser utilizados los métodos alternativos y homologar otros nuevos hasta la sustitución total de animales por los ensayos "in vitro" o en animales inferiores.

Por ello la investigación se ha dirigido hacia el desarrollo de los ensayos de corta duración, entre los que se encuentran los de genotoxicidad principalmente "in vitro". Dichos ensayos permiten una valoración y selección previa de los productos a ser analizados, indicando la posible necesidad de utilizar con posterioridad otras metodologías, por ejemplo ensayos de larga duración ó de carcinogenicidad (de la Peña y cols. 1990).

Las pruebas de genotoxicidad, a diferencia de las de carcinogenicidad, ó de los estudios epidemiológicos son rápidas, baratas y relativamente sencillas de realizar. Además la gran población de bacterias o células, expuestas al producto durante el ensayo, incrementa la probabilidad de detectar genotóxicos débiles, ya que, en ocasiones en los ensayos de carcinogenicidad con poblaciones de individuos relativamente más limitadas se obtienen resultados incorrectos (Hollstein y McCann, 1979; Claxton y col. 1988).

El poco espacio de tiempo transcurrido desde que se publicó el primer ensayo de mutagénesis "ensayo microsomal en Salmonella" ó "test de Ames" (McCann y col. 1975) y la gran cantidad de aplicaciones prácticas y reguladoras obtenidas con su uso hasta el momento, ponen de manifiesto la necesidad urgente que existía en detectar y controlar los agentes genotóxicos, así como la eficacia de los métodos empleados para su detección.

Los ensayos de mutagénesis se han convertido, debido a su elevado valor predictivo, en la correlación carcinogenicidad/mutagenicidad, y a la relativa facilidad con la que se pueden obtener los resultados, en los mecanismos utilizados de manera

rutinaria que nos acercan a la identificación de posibles carcinógenos y nos permiten la posibilidad de obtener curvas dosis/efecto, lo cual contribuye a una mayor extrapolación de resultados.

Sin embargo es importante saber que los ensayos de mutagénesis, tanto de corta como de larga duración, están todavía en fase de desarrollo. Desde 1975 muchos nuevos tests se han desarrollado e incluso el Test de Ames de Salmonella se ha modificado apreciablemente; esto es interesante por el conocimiento cada vez mayor que se va teniendo sobre el control de los agentes genotóxicos y carcinogénicos.

La función principal para los ensayos de genotoxicidad resulta ser un criterio importante a tener en cuenta, cuando se quiere conocer la condición de un determinado producto, ya que, como hemos comentado en otras ocasiones, no todos los mutágenos son carcinógenos, ni viceversa (Ashby y Purchase, 1985; Chung y Cerniglia, 1992).

Pero lo que si parece claro es que la gran mayoría de los carcinógenos ejercen su acción biológica a través de los ácidos nucleicos (Venitt y Parry, 1984; Auletta, 1990). Por todo ello para la evaluación de la carcinogenicidad de un determinado producto se deben realizar los ensayos de mutagénesis.

Los diferentes mutágenos cuando interactúa con el material genético celular pueden inducir distintos tipos de lesiones que van desde modificaciones de una base a roturas ó pérdidas cromosómicas.

Así el posible riesgo genético propio de la molécula de DNA debido a sus puntos nucleofílicos ó electrofílicos, cuando está expuesta a mutágenos ambientales, se basa o en la medición de modificaciones submicroscópicas de la secuencia del DNA (mutación génica) mediante el conteo de colonias que revierten a la mutación en los ensayos con organismos procariotas o en la identificación de aberraciones cromosómicas estructurales (mutación cromosómica) o numéricas (mutación

genómica), por medio de la microscopía óptica, en los ensayos de cultivos celulares (Kirsch-Volders y col., 1984).

De esta forma para detectar los distintos efectos genotóxicos inducidos por los múltiples tipos de mutágenos, tanto físicos como químicos que existen en los distintos tipos de ambientes, y para evaluar el riesgo que presentan tanto para la salud del hombre como al medio ambiente, se han ido desarrollando un número enorme de ensayos genotóxicos de corta duración que abarcan una amplia diversidad de alteraciones genéticas.

Se conocen en la actualidad una gran cantidad de ensayos de genotoxicidad, cuyo interés principal radica en detectar, identificar y clasificar agentes que posean la capacidad de inducir una alteración ó la modificación del material hereditario.

En principio no serían necesarios tal magnitud de ensayos, si únicamente influyera en la detección del agente de una manera directa ó indirecta la molécula de DNA, ya que su estructura es esencialmente igual en todos los organismos vivos. Pero existen una serie de factores secundarios que influyen en la interacción de la molécula con el DNA en forma y en cantidad, obligando a la existencia de un amplio espectro de organismos implicados en los ensayos de genotoxicidad.

Además en la determinación de la actividad genotóxica es también importante el tamaño del sitio diana del DNA y los procesos reparadores de la molécula de DNA, no siendo estos parámetros también muy diferentes de unos organismos a otros.

3.3. Estructura química\mutágeno\carcinógeno

En el apartado 3.1. hemos comentado la fuerte correlación existente entre la actividad mutagénica y el potencial carcinógeno de muchos productos químicos. En este apartado vamos a incluir un concepto nuevo "la estructura química del producto en cuestión". Ya que en los últimos años, se está empezando a considerar necesario

que previamente a ensayo/s de mutagénesis, se debe realizar una valoración del posible efecto que pueda tener el producto a ensayar según su estructura química, a la hora de interaccionar con la molécula de DNA. Esto facilitará en parte la tarea a la hora de elegir el ensayo/s de mutagénesis a aplicar.

Sabemos que genotóxicos son los agentes físicos, químicos y naturales que producen cambios en el ácido nucleico y componentes asociados a niveles de exposición subtóxica, originando una inactivación del DNA ó una modificación en las características hereditarias (ICPEMC, 1983), mientras que los que no dañan al DNA, sino que ejercen sus efectos a través de mecanismos indirectos se agrupan dentro de carcinógenos epigenéticos (Giner-Sorolla 1986). La mayoría de los tóxicos a una determinada concentración producen no solo un complejo daño genético, sino también citotoxicidad aguda no específica y por tanto la muerte celular.

Las sustancias químicas genotóxicas o carcinógenas son sustancias generalmente dotadas de una gran reactividad que producen una mayor incidencia de tumores malignos en animales con relación a los controles. Se conocen una gran cantidad de estos productos químicos en su mayoría de origen sintético, que se clasifican según el mecanismo y la capacidad que tienen para inducir lesiones en el DNA celular (Ashby y Tennant, 1991). Además, Rikus y Legator (1979) han hecho una revisión de los datos disponibles de realizar diferentes test bacterianos sobre 465 carcinógenos, clasificándolos según su estructura química. Las sustancias que mostraron mayor correlación (94%) entre actividad mutagénica y carcinogénica, fueron las que reaccionaban directamente con el ADN, o que podían activarse por enzimas metabólicas reactantes con el ADN. Las sustancias que por su estructura parecían no ser adecuadas para reaccionar con el ADN, mostraron baja correlación entre actividad carcinógena y mutagenicidad; estas últimas sustancias producirían cáncer por un mecanismo diferente, posiblemente no genotóxico.

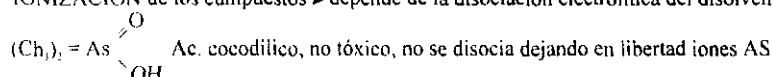
Hay evidencias por parte de numerosos autores que indican que pequeñas diferencias en los grupos funcionales de las sustancias químicas, (siendo estos los que

confieren la estructura química de las moléculas y los responsables a su vez de las características propias de cada sustancia química), influyen de manera significativa en los efectos biológicos de las sustancias pudiendo modificar las características toxicológicas del producto (Loomis, 1982; Shahin, 1987; Casarett y Doull's 1987; Ashby y Tennant, 1991; Chung y Cerniglia, 1992). En la Figura 5, se presenta un cuadro con procesos físicos y químicos, en él se observa que pequeñas diferencias estructurales modifican la toxicidad del compuesto. Uno de los ejemplos de la Figura 5, corresponde a los colorantes del grupo "azo" (derivados del átomo de nitrógeno, cuyo grupo funcional es " $-N=N-$ "). Este grupo de sustancias tiene un uso muy extendido en industrias de tipo alimenticio, farmacéuticas, papeleras, de curtidos de piel y tejidos, pinturas etc. Se sabe que estas sustancias en su ingesta oral, debido a la microflora intestinal se pueden metabolizar a aminas aromáticas (muchas de ellas mutagénicas en el test de Ames) ó pueden sufrir un proceso de reducción en el hígado (Chung, K-T 1983). Además se sabe que los colorantes activos biologicamente, son aquellos que contienen en su molécula radicales de p-fenilodiamina y bencidina, siendo las posibles reacciones posteriores las que pueden modificar la genotoxicidad del producto químico (Chung y Cerniglia, 1992).

En la Figura 6, se muestran algunas posibles reacciones químicas que pueden sufrir los radicales indicados y su posible efecto genotóxico.

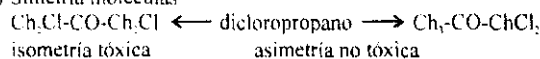
Se han realizado numerosos estudios (Shahin 1987; Tennant y col. 1991; Ashby y Tennant, (1988 y 1991); Ashby y cols. (1989) para definir la relación entre la estructura química de ciertas sustancias y su actividad en los procesos de carcinogenicidad y mutagenicidad, es decir para determinar el grado de prevención o vigilancia que hay que tener en cuenta sobre la estructura molecular de una sustancia química, en su posible interacción con la molécula de DNA y sus

- a) -IONIZACIÓN de los compuestos ► depende de la disociación electrolítica del disolvente

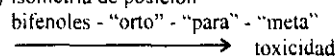


- b) - ESTRUCTURA MOLECULAR: moléculas saturadas (menos tóxicas)

Según: I) Simetría molecular



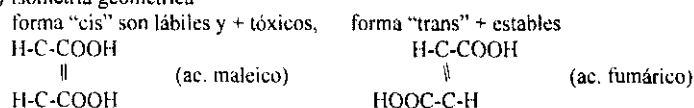
II) isimetría de posición



III) isimetría óptica, en general:

forma "levo" > toxicidad que forma "dextro" y forma "racémica"
(cocaína) > toxicidad (pseudococaína) (aunque hay excepciones)

IV) isimetría geométrica



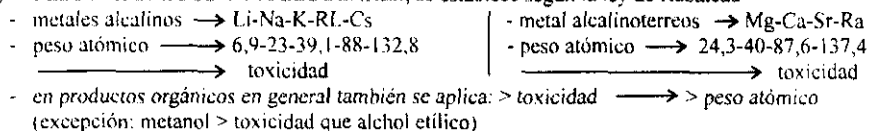
V) tautometría: (C=N)

nitrilos < toxicidad

(-N=C)

(carbilaminas > toxicidad)

- c) - PESOS ATÓMICOS Y MOLECULARES, se establece según la ley de Rabateau



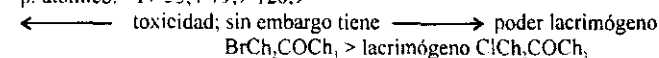
- d) - PRESENCIA DE ELEMENTOS Y GRUPOS FUNCIONALES (muy variada)

- sulfonización y carboxilación \downarrow toxicidad (compuestos + soluble y se elimina mejor)

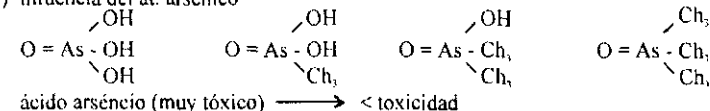
I) influencia del at. de halógeno: no sigue la ley de Rabateau**

halógenos: F-Cl-Br-I

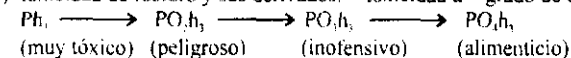
p. atómico: 19-35,4-79,9-126,9



II) influencia del at. arsénico



III) toxicidad de fósforo y sus derivados: < toxicidad a > grado de oxidación:



IV) influencia at. de azufre

- por sí solo generalmente no tóxico, da a la sustancia que lo contiene en su molécula propiedades de penetración a través de su epidermis

V) influencia del at. de nitrógeno y sus derivados (D.N)

- sustancia con grupo -N= < toxicidad que sustancia de grupo =Nh y -Nh₂

si además hay un grupo NO₂ o más \uparrow la toxicidad

- D.N: gr. azoico: -N=N- (en el hombre se excinde por el d. enlace y \rightarrow -NH₂ + -NH₂ (amina)*)

Figura 5. Diferencias moleculares en relación a su toxicidad.

* Según la naturaleza del grupo que se une a serán tóxicas o no.

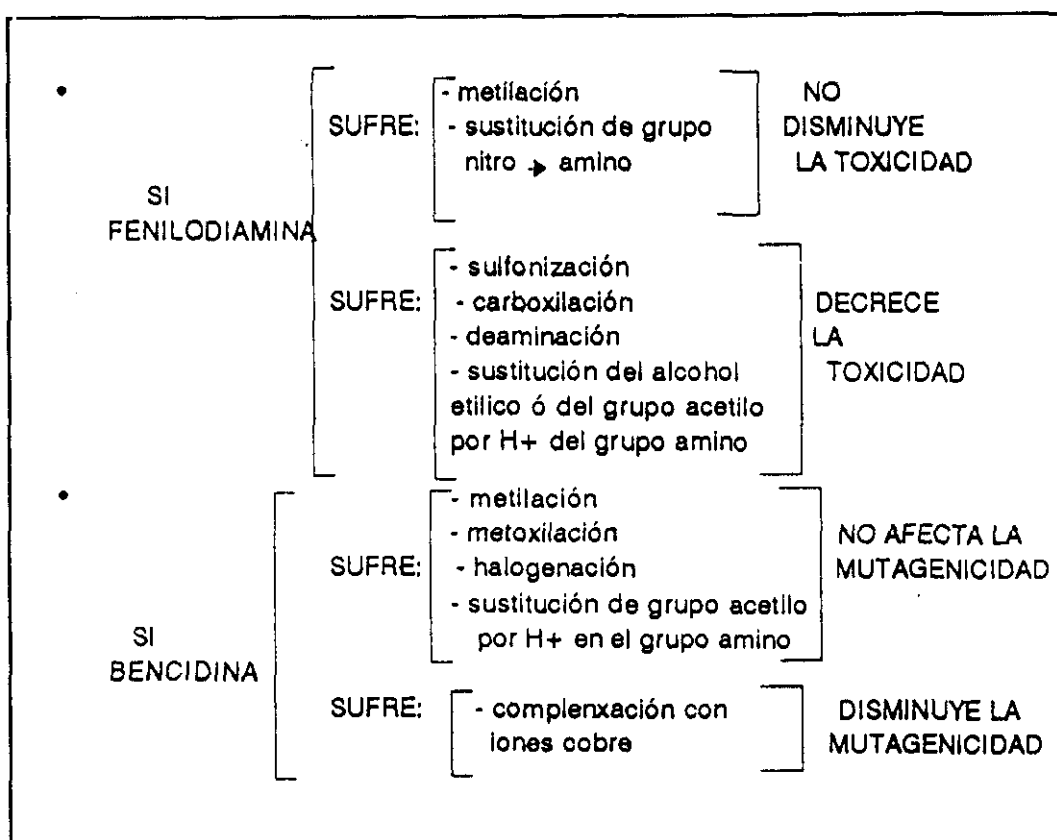


Figure 6. Sustancias que contienen el grupo "azo" y que dependiendo del tipo de reacción pueden modificar su genotoxicidad.

consecuencias. Los estudios se realizan de formas diversas, estableciéndose grupos que se clasifican según aspectos distintos. De esta forma se han analizado un número elevado de estructuras químicas diferentes, así como los isómeros, grupos funcionales o radicales con los que pueden ser sustituidos. Estas sustancias son moléculas naturales o sintéticas, de origen orgánico en su mayoría y relacionadas con el ser humano de alguna manera (pesticidas, colorantes, medicamentos, aditivos etc).

Uno de los equipos de investigación que participaron en estos estudios fue el de Tennanty y col. (1991), y utilizaron estructuras químicas seleccionadas por el U.S. Programme Nacional de Toxicología (NTP), clasificándolas en seis grupos diferentes

en función de reacciones químicas conocidas, número de lugares de interacción de la molécula de DNA con la sustancia, así como del peligro potencial que pueden entrañar dichas interacciones; los grupos que se establecieron son:

- compuestos de tipo nitro/amino aromáticos;
- compuestos de naturaleza electrofílica entre los que se incluyen los halógenos reactivos;
- compuestos con grupos halógenos no reactivos;
- compuestos que carecen de centros electrofílicos activos, pero lo poseen en potencia (estos compuestos parecen en principio no presentar peligro al reaccionar con la molécula de DNA);
- compuestos clasificados, no peligrosos por su estructura y muestran por lo tanto menor inquietud
- por último un grupo minoritario de químicos con estructuras variables de tipo alertante ó peligroso.

Otro de los equipos que participaron en el estudio fue el de Shahin, (1987), y establece la clasificación de los grupos unicamente en función de la estructura química y sus propiedades correspondientes, así los grupos de estudio son: aminas aromáticas monocíclicas, derivados del grupo benceno, compuestos amino-nitrofuranos, aflatoxinas, mycotoxinas (ejemplo sterigmatocistos).

El objetivo común de todos estos estudios era evaluar el riesgo potencial que entrañan para la salud humana, las distintas estructuras químicas y sus derivados clasificándolas en orden a los resultados obtenidos en los tests de carcinogenicidad en animales (rata y ratón) y en el ensayo de mutagenicidad en Salmonella. Se obtuvo que en un porcentaje elevado de sustancias, existía alta correlación entre los resultados de ambos ensayos y la estructura química.

Sin embargo esta generalidad no puede aplicarse indiscriminadamente a todas las clases de sustancias. Además puede haber excepciones debido a factores externos que influyen en los resultados de los ensayos de mutagenicidad y carcinogenicidad,

como son las diferencias metabólicas y los mecanismos reparadores que hay en los distintos tipos de células, tejidos, sexos o especies del animal utilizado; así como factores técnicos que también influyen en la sensibilidad relativa de los diferentes ensayos como la reproducibilidad del ensayo, etc..

En conclusión, los niveles que se han establecido para los productos químicos ensayados de acuerdo al nivel de actividad carcinogénica que desarrollan en las especies de animales ensayados son:

- "A"-> Carcinógenos en ambas especies (rata y ratón) e inducen tumores en uno ó mas tejidos.
- "B"-> Carcinógenos en dos ó mas tejidos de una misma especie.
- "C"-> Carcinógenos que afectan un único tejido en ambos sexos de una especie única.
- "D"-> Carcinógenos cuya actividad es específica en lugar, sexo y especie.
- "E"-> Agentes con evidencia equívoca de carcinogenicidad.
- "F"-> Agentes que resultan ser no carcinógenos en ambas especies.

En la Figura 7, se muestra para todas las sustancias químicas que clasificaron Ashby y Tennant, (1991), según los niveles establecidos (A-F), la correlación entre los valores de sensibilidad en el ensayo de *Salmonella typhimurium* (%) y la estructura alertante (EA), cuando interaccionan con el DNA.

La correlación que obtuvieron las investigaciones de Ashby y col.(1991) con respecto a la estructura química/mutagénesis/carcinógenesis es elevada en un porcentaje alto de productos (84%), existiendo también una alta sensibilidad entre ellos. Con todos estos resultados se establecen una serie conclusiones:

- i) Los estudios basados en la relación estructura\actividad pueden facilitar el desarrollo de productos químicos no peligrosos, para la salud humana, y para el medio ambiente.
- ii) Las estructuras similares no necesariamente predicen actividades biológicas similares.
- iii) Los isómeros pueden diferir substancialmente frente a su mutagenicidad y

carcinogenicidad.

iv) El valor predictivo de características estructurales para la mutagenicidad difiere de una clase de químico a otro.

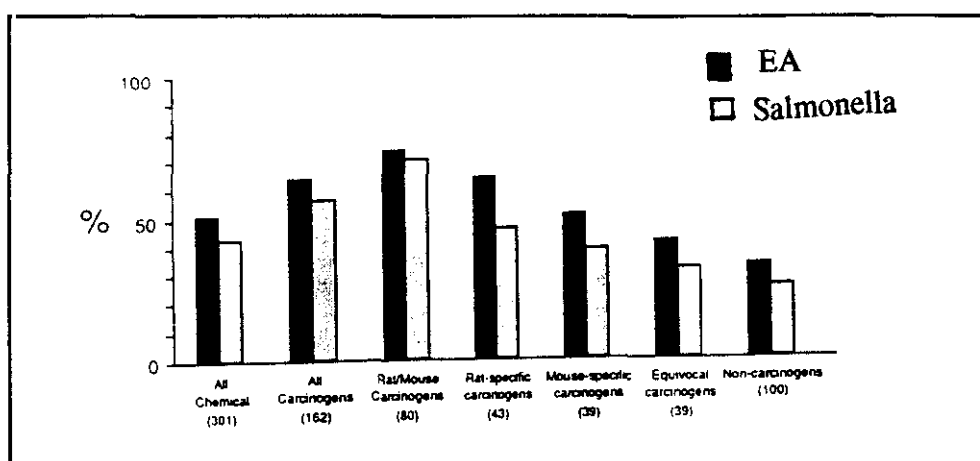


Figura 7. Correlación entre los valores de sensibilidad en el ensayo de *Salmonella typhimurium* his- (%) y la estructura alertante (EA), en el proceso de unión al DNA.

Pero Ashby y Tennatnt. (1991), además indican que hay otro grupo de sustancias con estructura química no peligrosa o alertante (147), que presentan resultados negativos en el ensayo de mutagenicidad en elevada correlación, sin embargo no ocurre lo mismo cuando se realizaba el ensayo de carcinogénesis, donde aparecían resultados positivos y negativos (sensibilidad del 0.04). Estos hechos, junto con resultados similares obtenidos en otros ensayos de genotoxicidad "in vitro" (células de mamífero) por parte de Johnson y cols. (1986), y con la apreciación de que ciertos químicos de diversos tipos (no mutagénicos) inducían tumores en ciertos tejidos muy concretos en roedores, parece indicar que la carcinogenicidad resulta ser una interacción específica entre las sustancias químicas y el tejido mas que una propiedad única e intrínseca de la sustancia.

Parece, por tanto, que existen dos tipos de productos carcinogénicos, unos en

que la correlación genotoxicidad\carcinogenicidad se hace patente y son predecibles en general por medio de los ensayos genotóxicos tanto "in vivo" como "in vitro", y otro segundo grupo que no tienen nada que ver con los mecanismos de acción de los productos genotóxicos y por tanto no son predecibles mediante el uso de técnicas genotóxicas.

Para este último grupo de carcinógenos (no corresponden a nuestro estudio), son necesarios todavía estudios básicos para entender el efecto que sucede en los animales, cuando son sometidos a dosis prolongadas de ciertas sustancias químicas, por otra parte, también sería importante poder distinguir cuales de los efectos producidos sobre el animal son secundarios y cuáles son críticos para provocar los tumores (proliferación de ciertos orgánulos ó enzimas en determinados tejidos). La intuición natural, por el momento, para ciertos investigadores hace pensar que los estudios en este último grupo de carcinógenos seran más efectivos utilizando sistemas "in vivo" que "in vitro".

4. ENSAYOS DE GENOTOXICIDAD

4.1. Validación de los ensayos genotóxicos

El grado de aceptación y utilización de los ensayos genotóxicos es muy variado, debido principalmente a las diferencias existentes entre los niveles de validación de estos. La validez de un ensayo viene dada por la correlación existente entre las respuestas obtenidas en dicho ensayo, para un número suficientemente elevado de agentes con potencial genotóxico o no genotóxico conocido, y las respuestas esperadas.

Así, según el grado de desarrollo en que se encuentre un ensayo, se pueden establecer tres niveles de validación (Purchase, 1982):

- a- Ensayo en desarrollo "nivel 1": cuando existen indicios del valor predictivo del mismo, pero se han estudiado pocos compuestos
- b- Ensayo en desarrollo "nivel 2": ensayo listo para ser utilizado como indicador de genotoxicidad, teniendo en cuenta las ventajas que puede tener sobre otros ensayos ya existentes.
- c- Ensayo establecido "nivel 3": ensayo empleado en un gran número de laboratorios, con un elevado número de compuestos ensayados.

En el grado de validación ó predicción de un ensayo influyen también factores epidemiológicos. Las limitaciones existentes en las bases de datos de los humanos con respecto a la correlación mutagénesis/carcinogénesis ha hecho necesario el desarrollo de los ensayos con modelos de animales (generalmente pequeños roedores). Los resultados de estos ensayos se miden en relación a los test predictivos (Figura 8); así como consecuencia de esta situación aparece el dilema asociado a la evaluación y extrapolación de los datos, convirtiendo la valoración de los resultados en un problema complicado.

Vista la incertidumbre que existe alrededor de la generalidad de los mecanismos de mutagénesis y las limitaciones existentes para los métodos de validación, por el momento resulta escaso el panorama para seleccionar un ensayo de toxicidad genética universal que se aproxime a las bases de la concordancia entre los tests predictivos y los ensayos de modelos en humanos y otros mamíferos.

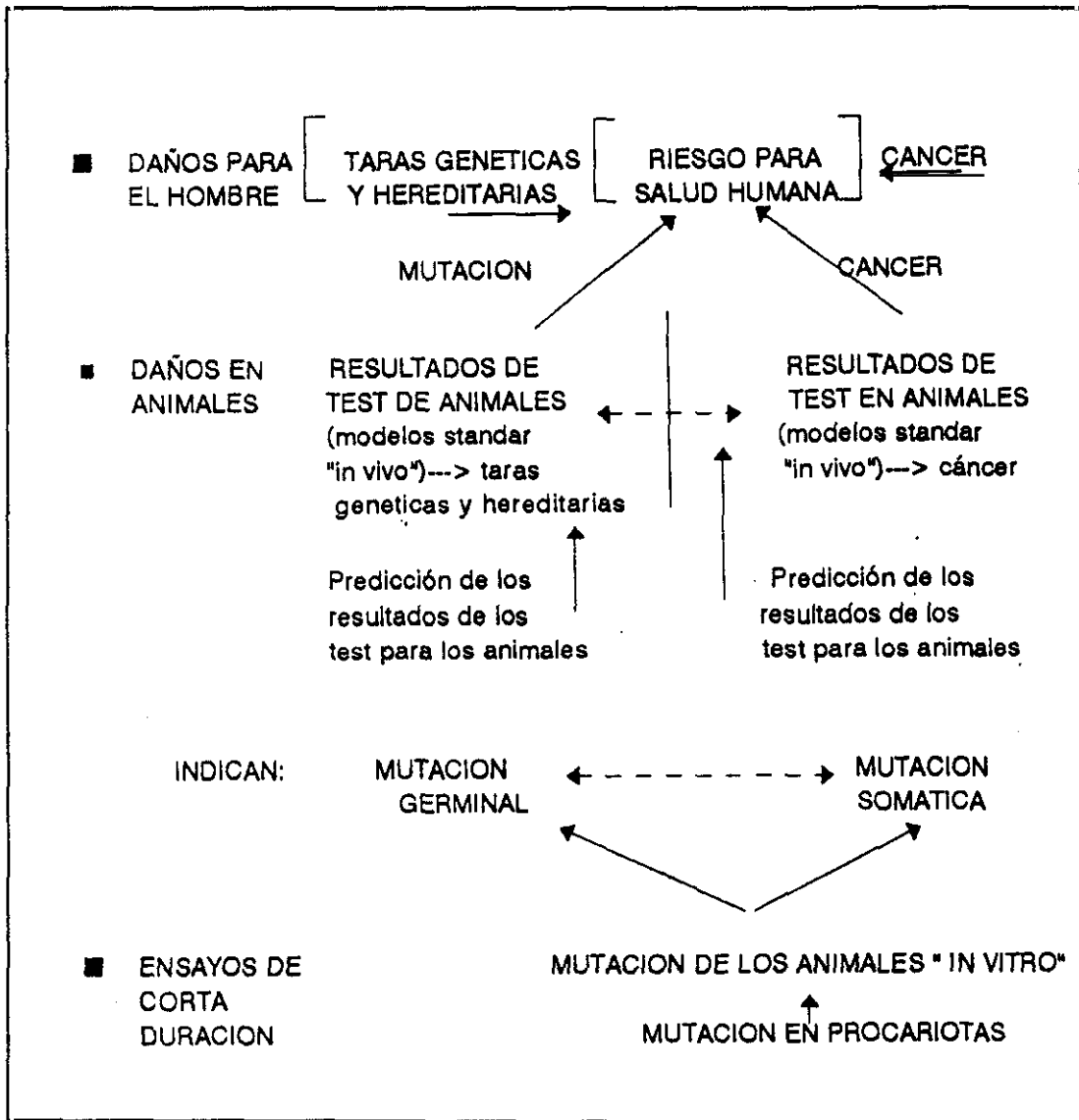


Figura 8. Valor predictivo de los tests de mutagenicidad. Descripción de los pasos seguidos para seleccionar ensayos de corta duración y predecir productos mutágenos y carcinógenos en los animales, extrapolando los resultados al hombre (Brusick, 1988).

4.2. Clasificación de los ensayos de genotoxicidad

Puede hacerse atendiendo al tipo de alteración genética detectada. Así los ensayos pueden clasificarse en cuatro grupos (OCDE 1986):

- 1- Ensayos de mutación génica
- 2- Ensayos de aberraciones cromosómicas
- 3- ensayos que detectan daño al DNA ó efectos relacionados
- 4- Ensayos que detectan alteraciones especiales.

Por otra parte la Agencia de Protección Ambiental (EPA), dentro de su programa de genotoxicidad, tiene establecida, una relación de los ensayos de genotoxicidad existentes (Brusick y Auletta, 1985). En esta relación los ensayos han sido clasificados por el IARC (1987 a y b) en:

- A- Ensayos de mutación génica
- B- Ensayos de daño al DNA y
- C- Ensayos de transformación celular.

Los ensayos de genotoxicidad, se pueden también clasificar, atendiendo al organismo indicador:

- ensayos bacterianos (*S.typhimurium*, *E. coli* y otras bacterias luminiscentes).
- ensayos con mohos y levaduras (*S. cerevisiae*, *N. crassa*, etc.)
- ensayos con insectos (*D. melanogaster*, *B. mori*)
- ensayos con cultivos celulares de mamíferos (*H. chino*, linfoma de ratón y linfocitos de sangre periférica ó total (Test Comet))
- ensayos con mamíferos (ratón, rata, hombre etc.) y
- ensayos con plantas (*A. cepa*, *V. faba*, etc.).

Los ensayos de mutagenicidad, además de determinar si un producto químico es capaz de inducir una mutación génica o cromosómica, nos informa sobre los mecanismos por los cuáles se puede producir dicha mutación. Además existen otra serie de ensayos que detectan otros cambios moleculares, como la conversión génica ó el sobrecruzamiento mitótico, pudiéndose utilizar para ampliar el espectro de acción de un determinado mutágeno (OCDE 1986). Estos últimos datos pueden jugar un papel predominante en la evaluación del daño, dado que la naturaleza del mismo puede determinarse en función al tipo de alteración provocada. En la Figura 9, se

presentan algunos de los principales métodos de estudio genotóxico.

- * Mutagénesis puntual:
 - Procariotas: - Test de Ames
 - Test de E. coli
 - Eucariotas:
- * Levaduras (Sacharomyces)
- * Células de mamífero
 - Ensayo de la mancha en el ratón
- * Alteraciones cromosómicas:
 - Roturas, Translocaciones:
 - Pruebas citogenéticas: IN VIVO e IN VITRO
 - Translocación hereditaria en ratón: IN VIVO
 - Ensayo de letalidad recesiva ligada al sexo: IN VIVO
 - Ensayo de letalidad dominante en roedores: IN VIVO
 - Pérdidas, ganancias: Test de aneuploidía
- * Efectos sobre el ADN:
 - Inducción de recombinación mitótica en Sacharomyces
 - Test de síntesis no conservativa del ADN
 - Test de micronúcleo
 - Precarcinogénicos: - Test de transformación celular

Figura 9. *Principales métodos de Estudio de la Genotoxicidad.*

4.2.1. Ensayos pre-mutagénicos basados en la QSRA

Hemos comentado anteriormente (apartado 3.3.) que previamente al ensayo de mutagenicidad, sería de gran utilidad la realización de otros tipos de ensayos basados

en la estructura química del producto que se estudia, y su interacción con la molécula de DNA lo cual, facilitaría el ensayo de mutagénesis a elegir.

Estas técnicas están basadas en las relaciones cuantitativas estructura/actividad (QSRA) y buscan una relación entre la actividad biológica de una serie de productos químicos y uno ó mas parámetros (electrónicos, de solubilidad, de grupos funcionales etc.) asignados a grupos químicos, siendo además estos ensayos cuantificables, de manera que podría valorarse la contribución de cada grupo a la actividad biológica de un producto. Entre las aplicaciones que posee la QSAR sería su utilización para predecir la posible genotoxicidad de una serie de productos químicos, así como su mecanismo de acción, pudiendo contribuir a la disminución del número de ensayos a realizar y en el caso de que sea necesario su realización, elegir cual es el método mas adecuado (Benigni y col. 1989; Shahin, 1987; Rosenkranz y col. 1991).

Este último concepto de considerar la estructura química de los productos es la consecuencia de la cantidad de ensayos que se pueden realizar con sustancias químicas de naturaleza muy diversa, pudiendo llegar a establecerse ciertos prototipos de uniones moleculares, en las que se puede llegar a producir la activación de las moléculas u otros tipos de interacciones como la detoxificación (Weisburger y col. 1982; Searle 1984; Williams y Weisburger, 1988). Estos métodos están aún en periodo de investigación y no deberían usarse para tomar decisiones que afecten a la salud humana u otras especies.

4.3. Estrategias para determinar el riesgo genotóxico: batería de ensayos

En la determinación del riesgo de una sustancia química, una premisa clave es su posible genotoxicidad (Directiva 84/449/CEE y 87/302/CEE). Como ya se ha comentado, los tres niveles de mutación que existen: génica, cromosómica y genómica están relacionados con la activación y expresión de los oncogénos y con la pérdida ó inactivación de los genes supresores de tumores (Friend, 1990). Esta diversidad en la capacidad de mutación de la molécula de DNA, y la necesidad de obtener una

información adecuada y lo mas completa posible sobre el potencial mutagénico de un producto, hace que resulte de suma importancia la elección de una serie combinada de ensayos.

El hecho de que en ocasiones algunos ensayos de corta duración utilizados en predecir el potencial carcinogénico de una sustancia puedan no ser lo suficientemente claros para predecir el posible riesgo genotóxico de la sustancia en cuestión (Rosenkranz y col. 1991), y por otro lado, la existencia del enorme número de ensayos de mutagénesis (bacterias, cultivos, hongos, etc.) destinados, también a predecir el riesgo genotóxico de los productos químicos al hombre, indica claramente que por si solo ningún ensayo genotóxico proporciona los datos suficientes para establecer el posible riesgo genotóxico, o predecir la carcinogenicidad de un producto químico al hombre.

Además estos hechos se justifican porque:

1º - debido a la diversidad de posibles efectos genéticos en la molécula de DNA, la realización de un único ensayo, solo informa de efectos específicos (mutación génica ó aberraciones cromosómicas) y

2º - un único ensayo puede no ser lo suficientemente sensible, para detectar la existencia de un efecto mutagénico, debido posiblemente a varios motivos, entre ellos la naturaleza del mutágeno, la cual puede ser específica para reaccionar con una especie u órgano determinado, siendo necesario para su detección, la utilización del ensayo apropiado (OCDE 1986).

De todo esto se deduce que para tener cierta seguridad en la valoración del riesgo genotóxico de un producto y predecir su posible carcinogenicidad, se requiere la realización de una bateria inicial de ensayos a distintos niveles evolutivos, que cubran un amplio abanico de posibles mutaciones y sirva además para corroborar los resultados obtenidos, pudiendo, en el caso de obtener resultados positivos ó dudosos, clarificarlos mediante ensayos en niveles tróficos más evolucionados, que nos acercan mediante mecanismos de interpolación al hombre. (Dearfield y col. 1991).

Hasta el año 1989, no había la disciplina suficiente a la hora de elegir los ensayos que debían realizarse para valorar los productos químicos, pues se realizaban ensayos diferentes en los distintos laboratorios, para un producto determinado y cuándo se realizaba el mismo ensayo, en ocasiones, el protocolo y las condiciones de ensayo eran distintas (Benigni, y Giuliani, 1991).

Es a partir de esta fecha en que varios organismos oficiales hacen una revisión en la que se actualizan los conocimientos científicos, obtenidos hasta el momento en el tema y crean una serie de programas, relacionados con los productos peligrosos como la Office of Pesticide Programmes (OPP) y la Office of Toxic Substances (OTS). En estos programas se establece que los productos en su primer estudio, tienen que ser sometidos a una batería definida de ensayos de mutagénesis (Dearfield 1989). Posteriormente los resultados de estos ensayos de mutagénesis, son enviados a la U.S. Environmental Protection Agency (USEPA) indicando la información necesaria para la valoración del peligro mutagénico potencial del agente químico objeto de estudio, el cual de esta manera, está sujeto a regulación por parte de la Federal Insecticide, Fungicide, and Rodenticide Act (FIFRA) (Fig. 10).

El fin principal de estos programas es establecer y unificar los pasos a seguir de los productos químicos en su investigación y regulación en sus inicios.

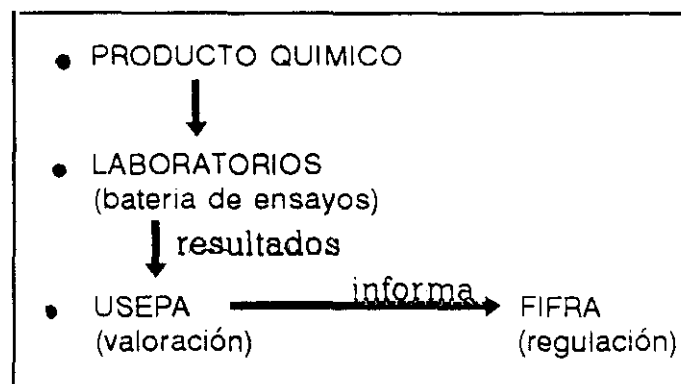


Figura 10. Organismos oficiales para la validación de un producto químico

En la Figura 11 se muestra la secuencia de ensayos de mutagénesis propuesta por la OOP realizada a distintos niveles evolutivos. En la selección de esta batería de ensayos no hay pruebas, que se ocupen de la detección de mutágenos, que induzcan aberraciones cromosómicas de tipo numérico (sucesos aneuploides etc.). Esto es debido, a que por el momento no hay ensayos válidos para este tipo de mutación (Dellarco y col. 1986)

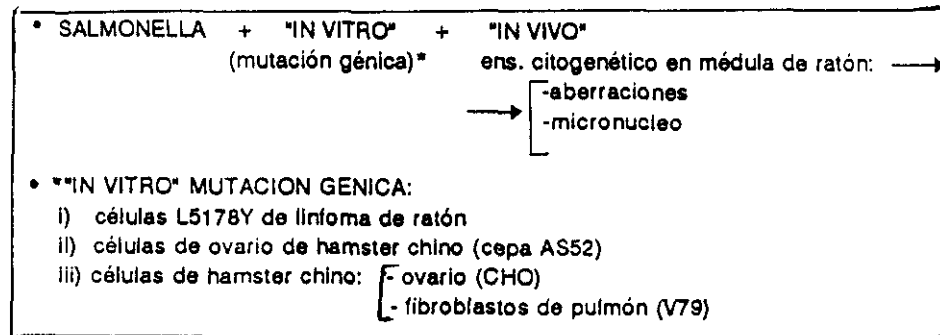


Figura 11. Guía de ensayos de mutagenicidad. Propuesta por la Oop.

Una vez realizada una identificación inicial del producto químico, si no se aprecia peligro mutagénico no será necesario realizar una investigación adicional; si por el contrario fuera necesario tener un conocimiento mayor del producto químico que se investiga sobre la capacidad para inducir, activar ó no mutaciones hereditarias (incluyendo mamíferos), será necesario utilizar todos los datos disponibles para su valoración:

- datos mutagénicos
- relación estructura/actividad (SAR)
- mecanismos de acción: la farmacocinética y metabolismo de producto químicos
- resultados de los ensayos de efectos reproductivos
- la especificidad del órgano diana
- efectos crónicos y subcrónicos
- interacción del producto químico con el DNA gonadal

Posteriormente, si la evidencia todavía sugiere continuar con ensayos adicionales, estos tendrían que ser ensayos citogenéticos en espermatogonias y/o

espermatoцитos, en los roedores ó ensayos del letal dominante ó cualquier tipo de ensayo que evidencie la interacción del químico, con las células germinales de mamíferos.

El conocimiento de la valoración del riesgo cuantitativo del producto al hombre depende de los datos mutagénicos obtenidos y de otros factores relevantes, tales como los niveles de exposición al hombre, al producto, al uso de patrones de productos químicos y la cantidad de producto liberada al ambiente.

La OTS recientemente, como ya hemos comentado realiza también una revisión del Acta sobre Control de Sustancias Tóxicas (TSCA) (1982). En esta revisión los esquemas generales de los ensayos de mutagenicidad designados para la búsqueda directa de agentes potencialmente cancerígenos se modifican sustancialmente de forma que a partir de la fecha el número de bioensayos del cáncer de larga duración a realizar se disminuye en lo posible (Dearfield 1991).

La diferencia principal entre estos dos tipos de programas (OPP Y OTS) estriba fundamentalmente, en que la OTS no especifica los ensayos "in vitro" que han de desarrollarse, en los estudios de mutación génica,

En definitiva la realización de los ensayos mutagénicos sirven:

- i) de base a una exposición inicial del producto
- ii) para ensayar el potencial del agente químico de nueva síntesis o previa comercialización, en su capacidad para inducir efectos genéticos hereditarios y
- iii) son la prueba con un elevado valor de fiabilidad, de que un producto químico puede tener potencial carcinogénico ó no.

4.3.1. Importancia del Test de Ames

La elección o incorporación del ensayo microsomal de Salmonella typhimurium, en la mayoría de las baterias de ensayos existentes es fundamentalmente

por las características que presenta: ensayo de mutación génica reversa, en el que se pueden emplear varios tipos de cepas bacterianas específicas que detectan mutaciones puntuales, pudiendo identificar el tipo específico de efecto genético producido (ejp. sustitución de base, mutación de cambio de base) por los agentes físicos o químicos, los cuales activan este sistema bacteriano (Maron y Ames 1983).

Otras de las causas de elección del Test Ames son su simplicidad, sensibilidad y precisión de forma rápida y económica, por lo que se utiliza de forma prácticamente rutinaria en la mayoría de los laboratorios del mundo, de toxicología genética, resultando como consecuencia de este amplio uso del ensayo una extensa base de datos (Kier y col. 1986).

Además este ensayo es extremadamente útil en la detección de mutagenicidad en muchas clases de productos químicos activos biológicamente, especialmente los que parece que actúan mediante un mecanismo electrofílico (Ashby y Tennant 1988), siendo como indican algunos autores (Heddie, 1982) el test "in vitro" con índice mas bajo de falsos positivos y negativos.

5. ACTIVACION METABOLICA

La mayoría de los mutágenos y carcinógenos no son capaces de reaccionar directamente con el DNA. Estos compuestos, precisan ser activados metabólicamente por ciertas enzimas presentes en el retículo endoplasmático de las células eucarióticas y entoces se les conoce con el nombre de premutágenos y precarcinógenos (Malaveille y col. 1979).

En la detección sistemática de cancerígenos potenciales mediante ensayos de mutagenicidad bacteriana, se plantea un inconveniente y es que los microorganismos, utilizados en estos ensayos, carecen, en su mayoría, de las enzimas responsables de la biotransformación; sin embargo, este problema ha podido ser superado , en parte,

mediante la incorporación de sistemas de activación metabólica de mamíferos en los ensayos de mutagenicidad "in vitro" (Natarajan y col., 1976; y de la Peña y col. 1990).

Se han utilizado como sistemas de activación metabólica extractos celulares, células de mamíferos y biotransformación "in vivo" con huésped intermedio, para compensar las capacidades limitadas de las bacterias para metabolizar algunos premutágenos y/o precarcinógenos. Los fluidos biológicos y las fracciones tisulares, tanto del hombre como de los animales, expuestos a carcinógenos o mutágenos, pueden emplearse como fuente de obtención de metabolitos (Maron y Ames, 1983). Así como la utilización de fracciones de plantas como sistemas de activación metabólica, son otro aspecto de los métodos alternativos y es una línea de investigación que se está desarrollando en varios proyectos de investigación del programa de la CEE *Genetic effects of environmental chemicals* (Llangostera, 1989).

5.1. Fracción postmitocondrial de hígado de rata (S9)

El sistema de activación metabólica más ampliamente utilizado en los ensayos de mutagenicidad es el sobrenadante de la fracción postmitocondrial de hígado de rata, que resulta tras centrifugar a 9.000xg el homogeneizado de hígado, el cual se conoce con el nombre de fracción S9 y está formado por los microsomas y el citosol celular. Una centrifugación posterior a 10.000xg. permite el aislamiento de microsomas, los cuales se emplean con mayor frecuencia en los ensayos de mutagénesis (IARC, 1986).

La utilización de la S9 presenta como ventajas:

- Obtención sencilla
- Contiene la mayoría de las enzimas asociadas con el metabolismo de xenobióticos
- La disponibilidad de gran cantidad de datos basados en estudios previos
- Es un buen sistema para realizar estudios de rutina
- Favorece la activación de mutágenos y carcinógenos.

Sus inconvenientes son:

- Presenta un alto contenido de sustancias nucleófilas que podrían interaccionar con los carcinógenos últimos que son electrófilos
- Es difícil identificar las enzimas implicadas en la biotransformación de un determinado producto (IARC, 1980; y de la Peña y col., 1990).

El sobrenadante de la fracción postmitocondrial de hígado contiene la mayor parte de las enzimas que participan en la biotransformación (Figura 12) (IARC, 1980) pero su contenido en cofactores es bajo, por lo que en la realización de los ensayos de mutagénesis, la S9 es enriquecida con NADP y glucosa-6-fosfato como sistema generador de NADPH, denominándose +S9 mix (Ames y col. 1975; y Maron y Ames, 1983).

El efecto mutagénico de un agente precursor genotóxico "in vitro" es el resultado de un balance entre varios y, a menudo, numerosos pasos metabólicos, algunos de los cuales activan y otros detoxifican los productos químicos, además es dependiente de la potencia y estabilidad del compuesto ensayado y del sistema de activación metabólica empleado.

Cualitativamente, el sistema enzimático más importante para la activación y detoxificación de carcinógenos y mutágenos es el de la monooxigenasa microsomal, dependiente del citocromo P-450. Este sistema consta de tres componentes (Lu, 1976): Una hemoproteína denominada citocromo P-450, una flavoproteína conocida como NADPH-citocromo-c- reductase o NADPH-citocromo P-450 reductasa y, un fosfolípido, la fosfatidilcolina.

Las reacciones catalizadas por la hidroxilasa microsómica, necesitan oxígeno molecular y fosfato de nicotinamida adeninadinucleótido en su forma reducida. El NADPH se utiliza para reducir el oxígeno molecular, de modo que pueda ser transportado por el citocromo P-450 al compuesto por oxigenar; seguidamente el oxígeno se fija en los compuestos habitualmente como grupo hidróxilo.

<u>RETICULO ENDOPLASMICO</u> <u>(FRACCION MICROSOMAL)</u>	<u>CITOSOL</u> <u>(FRACCION</u> <u>100.000XG)</u>
<ul style="list-style-type: none"> . Monooxigenasa . Oxidasas independientes del citocromo P-450 . Epoxido hidrasa . Glucuronyl transferasa . Azo y nitro-reductasas . Amidasas . Esterasas 	<ul style="list-style-type: none"> . Glutación s-transferasa . Sulfotransferasas . Deshidrogenasas . Azo-, Nitro-y Quinona- -reductasas . Esterasas . Peroxidasas

Figura 12. *Enzimas presentes en el sobrenadante postmitocondrial de hígado y otros organos en los que se metabolizan carcinógenos y mutágenos.*

La NADPH-citocromo-c-reductasa utiliza el NADPH^+ para reducir el citocromo P-450; el fosfolípido facilita la transferencia de electrones desde el NADPH hasta la hemoproteína; el citocromo P-450 actúa como oxidasa terminal, por un lado enlaza el sustrato y el oxígeno y, por otro, cataliza la incorporación de un átomo de oxígeno al sustrato y la reducción a agua del otro átomo de oxígeno. El citocromo P-450 parece ser el más importante de los tres componentes implicados en el metabolismo microsómico de xenobióticos debido a su papel en la activación del oxígeno y de su unión con el sustrato. Existe en múltiples formas con diferentes especificidades, frente al sustrato o con especificidades distintas superpuestas. Muchos factores que afectan al metabolismo de xenobióticos, tales como la edad, sexo, estirpe, especie, condiciones ambientales, nutrición y dieta, factores inmunológicos, estado hormonal, inductores, inhibidores, estados de enfermedad, stress, etc. podrían ejercer su efecto alternando las cantidades relativas o las actividades de las diversas formas de citocromo P-450 (IARC, 1980).

La importancia del complejo hidroxilante dependiente del citocromo P-450, se basa en dos razones:

- 1) las reacciones catalizadas por este sistema enzimático originan, frecuentemente, intermedios altamente reactivos que podrían ser los cancerígenos últimos.
- 2) el metabolismo oxidativo, mediado por dicho sistema, constituye casi siempre el primer eslabón en el metabolismo de xenobióticos (IARC, 1980).

En la respuesta mutagénica obtenida para un determinado compuesto, pueden influir algunos factores que son dependientes del sistema de activación metabólica, entre otros, la procedencia de la S9 y la dieta (Vaca y Harms-Ringdah, 1986), edad y sexo del organismo donante, el agente utilizado como inductor enzimático, las características del compuesto a ensayar, la velocidad de formación de metabolitos y la cantidad de S9 utilizada en el ensayo (Malaveille y col. 1979, Bartsch y col. 1982, e IARC, 1980).

Aunque la concentración de S9 utilizada rutinariamente, por lo general, permite detectar una amplia variedad de mutágenos químicos que requieren activación metabólica, es conveniente determinar la concentración óptima de fracción S9 necesaria para metabolizar el producto. Esta varía dependiendo de las características y de la concentración del compuesto a ensayar (Robertfroid, 1980). Por otra parte, el metabolismo "in vitro" de productos químicos o agentes genotóxicos es estrictamente dependiente de las condiciones del método de ensayo utilizado.

Los resultados obtenidos en los ensayos de mutagenicidad con activación metabólica (S9), son indicativos del riesgo genotóxico potencial de un producto para el hombre. Para sacar conclusiones válidas de tales ensayos, se requiere un conocimiento más profundo de todas las reacciones metabólicas "in vitro" en las condiciones experimentales del ensayo.

El efecto mutagénico de un agente precursor genotóxico "in vitro" es el

resultado de un balance entre varios y, a menudo , numerosos pasos metabólicos, algunos de los cuales activan y otros detoxifican los productos químicos. También es dependiente de la potencia y estabilidad del compuesto ensayado y del sistema sistema de activación metabólico empleado.

El uso de sistemas de activación metabólica en los ensayos de mutagénesis bacterianos permite reproducir "in vitro" un modelo análogo al que se realiza "in vivo". Este hecho ha contribuido a aumentar la utilidad de los ensayos de mutagénesis bacterianos en la predicción o confirmación de los efectos cancerígenos de los productos químicos en los animales y en hombre.

5.2. Inducción Enzimática

Existen sustancias capaces de aumentar la actividad de los sistemas enzimáticos. Estas sustancias químicas, se han denominado inductores enzimáticos y ejercen su propia actividad mediante un aumento cuantitativo de las enzimas y de los componentes involucrados en el metabolismo de xenobióticos.

Se conocen gran número de sustancias químicas que actúan como inductores, éstos se pueden clasificar en dos grupos: Grupo I: formado por sustancias del grupo de barbitúricos (fenobarbital). Estos inductores, son capaces de elevar los niveles de enzimas implicadas en el metabolismo oxidativo, especialmente de hidrocarburos alifáticos. De igual forma incrementan los niveles de citocromo P-450 en los extractos microsómicos de animales previamente inducidos; Grupo II: en este grupo se incluyen los hidrocarburos aromáticos policíclicos. Estos inductores son capaces de elevar los niveles de enzimas implicados en la hidroxilación aromática, especialmente de la benzopireno hidroxilasa. La utilización de Aroclor-1254 (Ames y col., 1975) como inductor en la obtención de S9 para la activación metabólica "in vitro", se debe a que esta mezcla de difenilos policlorados incrementa los niveles de hidroxilasa microsómica dependiente de citocromo al igual que el fenobarbital y también origina un aumento de la hidroxilación aromática, inducida por el metilcolántreno y otros hidrocarburos aromáticos policíclicos.

II- OBJETIVOS

Hasta el momento las aguas continentales han sido y son el medio natural al que van a parar vertidos de todo tipo, muchos de los cuales contienen sustancias mutagénicas, carcinogénicas y teratogénicas, provocando con ello riesgos para la salud humana y el medio ambiente. El río Tajo a su paso por la Comunidad Autónoma de Castilla-La Mancha, recibe de forma indirecta muchos de los vertidos originados en la Comunidad de Madrid (urbanos, industriales, agrícolas, etc.), y de forma directa los que se generan en la propia comunidad de estudio. Por tanto, recibe una gran variedad y cantidad de compuestos potencialmente genotóxicos entre los que puede surgir sinergismos, antagonismos o potenciaciones. Existen escasos estudios sobre el carácter genotóxico de éstas aguas (Tajo) pero si brotes repetidos de toxicidad animal; y a ello se une la falta de un método estandarizado, adecuado, para la calificación y cuantificación de la genotoxicidad en las aguas del Tajo.

De ahí, el planteamiento del presente estudio en el que se marcan los siguientes objetivos generales:

- 1º - Detectar y analizar el potencial genotóxico de las aguas del río Tajo a su paso por la Comunidad Autónoma de Castilla-La Mancha e inicios de la de Extremadura (5 puntos de muestreo) en el período de un año: ensayando con distintas cepas de *Salmonella typhimurium* sensible a distintos tipos de genotóxicos (presumiblemente existentes en las aguas) y aplicando el Test de Ames. (Para la evaluación genotóxica de los posibles contaminantes en función del tipo de mutación que provocan, su posible origen, además, de su distribución espacio temporal, se contó con un inventariado de los vertidos al área de estudio junto con los parámetros de índice de calidad de las aguas muestreadas.
- 2º - Una vez cubierto el objetivo 1; definir el método estándar más adecuado como medida de control técnico-sanitaria para la detección de genotoxicidad en las aguas de esta zona del río. De esta forma se podría detectar la presencia de posibles genotóxicos de manera eficaz, rápida y económica. Lo que permitiría tomar las medidas de seguridad oportunas para evitar el riesgo de un potencial carácter genotóxico.

Dentro del 1º objetivo general nos propusimos los siguientes objetivos específicos de trabajo:

- 1º - Determinar de forma genérica el tipo de sustancias genotóxicas existentes según su mutagenicidad inducida en las distintas cepas de *Salmonella typhimurium*, mutágenos que causan: mutaciones puntuales, de sustituciones de pares de bases o de cambio de lectura "frameshift", para identificando los posibles tipos de mutagéneos y cepas que resultan mas sensibles, y por tanto especificidad para determinar mutagéneos en esta zona del río.
- 2º - La distribución espacial de estos genotóxicos a lo largo de la zona del río estudiada (5 estaciones), lo que sería consecuencia de los vertidos recibidos y las posibles interacciones entre ellos condicionadas por las características fisico-químicas del río.
- 3º - Determinar la distribución temporal del potencial genotóxico del río. Ver cuando se producen los incrementos y los descensos de dicha genotoxicidad con arreglo a las estaciones del año.
- 4º - Incidencia de la carga genotóxica del río en la Comunidad de Extremadura, para ello se fija un punto de muestreo (P3) justo antes del límite entre las Comunidades de Castilla-La Mancha y la de Extremadura, y otro aguas abajo, dentro de la Comunidad de Extremadura.
- 5º - Tratar de predecir la posible genotoxicidad de las aguas para animales mamíferos, mimetizando en el ensayo el sistema de detoxificación de mamíferos, digiriendo las distintas fracciones de las muestras con un extracto microsomal de hígado de rata, S9. Con ste mecanismo habrá toxicidad que desaparezca, pero pueden a parecer otras.

III- DESCRIPCIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO

1. CARACTERISTICAS GENERALES DE LA ZONA

El curso del río Tajo forma la llamada fosa o depresión del Tajo a paso por las Comunidades Autónomas de Madrid, Castilla-La Mancha y parte de la de Extremadura. Esta zona es una región predominantemente llana con altitudes que oscilan entre los 600 y los 1.100 m y está constituida por sedimentos del Terciario de muy diverso carácter, excavados por la erosión fluvial reciente del río Tajo y sus afluentes. En ella podemos distinguir básicamente dos tipos de unidades sedimentarias: una de origen detrítico (arenas y arcosas) mas cercana a la sierra, y otra evaporítica, de origen lacustre (yesos, arcillas y margas yesíferas) que forman parte del mismo proceso que originó La Mancha. Son materiales que alcanzan un espesor de varios centenares de metros y que por su solubilidad y composición confieren un alto contenido en sales a las aguas que discurren entre ellos. La franja inferior de la depresión corresponde a la zona de sedimentos fluviales cuaternarios, esencialmente gravas y arenas, que forman un sistema de terrazas a distintas alturas (10, 30 y 50 m) sobre el cauce de los ríos y aluviales.

Las características del suelo, vegetación, clima o pluviosidad de la zona, se establecen en base a la geomorfología de la zona, contrastando notoriamente con las originadas en las zonas próximas de altitudes superiores, que corresponden al Macizo Central. De esta forma los suelos son mayoritariamente calizos (sobre rocas ricas en caliza o yesos, pH básico y con abundantes nutrientes minerales. Los cultivos de regadío ocupan la mayor parte de la extensión del suelo y, la vegetación natural queda relegada a estrechas franjas junto a los cauces: choperas, sauces, juncales, olmedas, etc.

El clima se considera de tipo mediterráneo contrastado, presenta temperaturas medias anuales de 14°C. La media de los meses de Enero se sitúa en torno a los 5°C, superándose los 24°C en Julio (Aguiló, 1983). La pluviosidad se caracteriza por un período seco estival, una escasa precipitación invernal y dos estaciones lluviosas:

primavera y otoño. Los valores medios de precipitación en esta zona son entre los 400-600 litros/año. Aunque hay que indicar que en altitudes superiores de la Cuenca del Tajo, por donde fluyen los ríos que posteriormente vierten sus aguas al Tajo se recogen mas de 1.500 litros anuales de agua. También hay que destacar que de un año a otro, existen diferencias de hasta el 40% en las precipitaciones, parece ser que las tormentas juegan un papel importante en dichas irregularidades.

En las Figuras 13 a 19 (págs. 63 a 66) hemos representado los valores medios mensuales de precipitación total de siete estaciones de pluviometría situados en la cuenca del río Tajo: La Puebla de Montalbén, Carpio de Tajo "Castrejón", vivero frutal de Cazalegas, Cabanuelas en Talavera de la Reina, La Estrella, Puente del Arzobispo y en la finca el Guardaperal; todas las estaciones se encuentran en la provincia de Toledo, excepto la última que se sitúa en la de Cáceres (Figura 20). La situación de las estaciones con respecto a nuestros puntos de muestreo son las que mas pueden informar acerca de los períodos fluviales del área estudio. Dichas estaciones u observatorios pertenecen al Instituto Nacional de Meteorología, e incluyen el período de tiempo en que realizamos los muestreos del presente trabajo. De un rápido análisis de esas Figuras se aprecian que existieron dos épocas de máximas precipitaciones en dichos observatorios: Septiembre-Noviembre de 1990 y Febrero-Marzo de 1991. Existe un tercer máximo de precipitación pero solamente en algunas (Castrejón y Cabanuelas), en el mes de Abril de 1990, en esta fecha todavía no se habían iniciado los muestreos, pero nos indica que en la primavera anterior a los mismos se habían producido precipitaciones. Los mínimos se dieron en el verano de 1990 y en la primavera-verano de 1991, excepto en las estaciones de Carpio de Tajo "Castrejón" y Cabanuelas donde hubo ligeras precipitaciones en la primavera de 1991. Durante este lapso de tiempo por tanto, hubo un verano seco, con precipitaciones no muy abundantes en el otoño y parte del invierno, para de nuevo iniciarse al principio de la primavera.

Respecto a la población y a la industria, en esta zona se asientan núcleos de gran densidad urbana, industrial e agrícola generando tal magnitud de diversos tipos de vertidos, que en ocasiones superan lo que le correspondería por densidad de población.

PUEBLA DE MONTALBAN (TOLEDO, n° 3296)

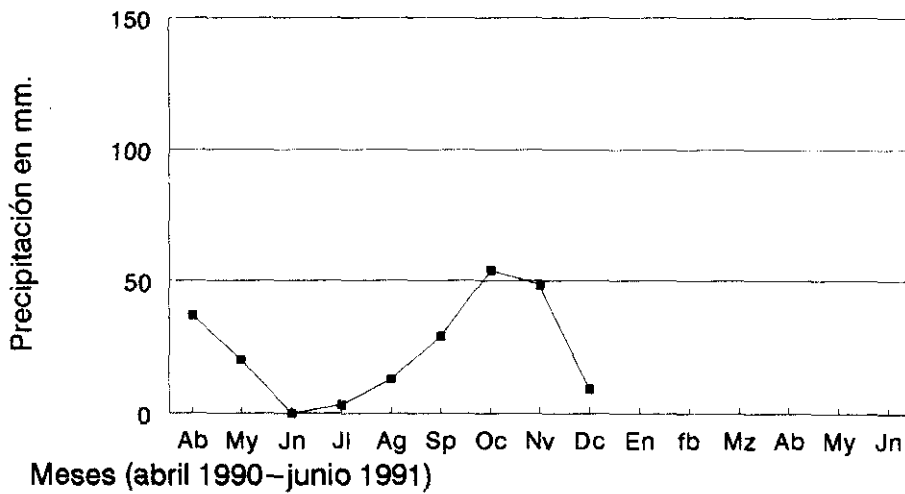


Figura 13. *Datos mensuales de precipitación. La estación se localiza en el mapa de la zona, Fig. 20, con el ▲ A.*

CARPIO DE TAJO "CASTREJON" (TOLEDO, nº 3303)

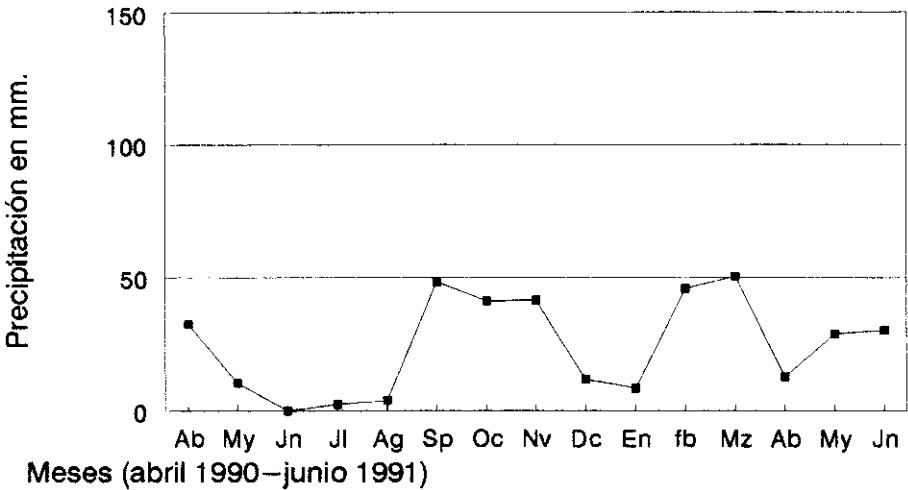


Figura 14. Datos mensuales de precipitación. La estación se localiza en el mapa de la zona, Fig. 20, con el Δ B.

VIVERO FRUTAL DE CAZALEGAS (TOLEDO, nº 3363)

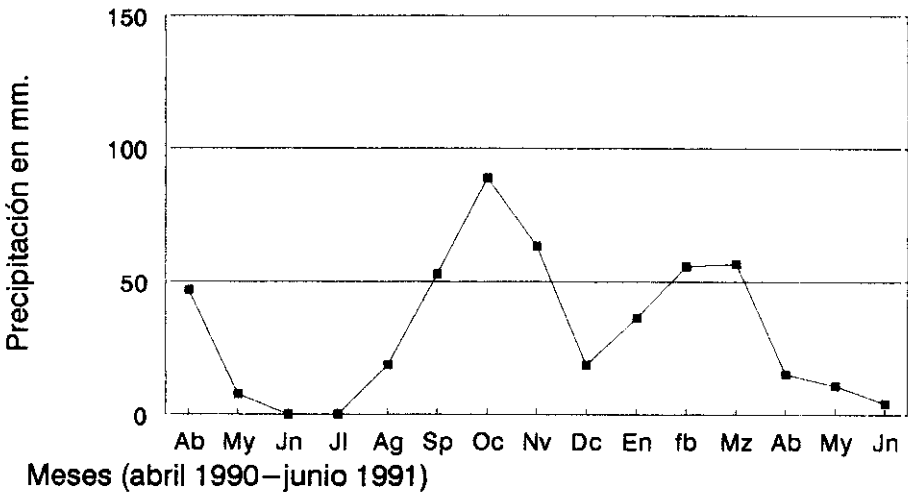


Figura 15. Datos mensuales de precipitación. la estación se localiza en el mapa de la zona Fig. 20, con el Δ C

CABANUELAS–TALAVERA (TOLEDO, nº3365)

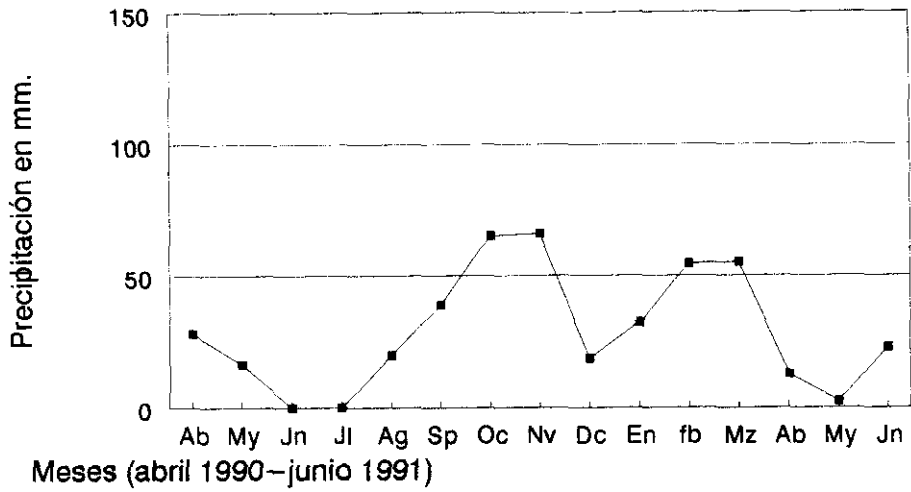


Figura 16. Datos mensuales de precipitación. La estación se localiza en el mapa de la zona, Fig. 20, con el \blacktriangle D.

LA ESTRELLA (TOLEDO, nº 3377)

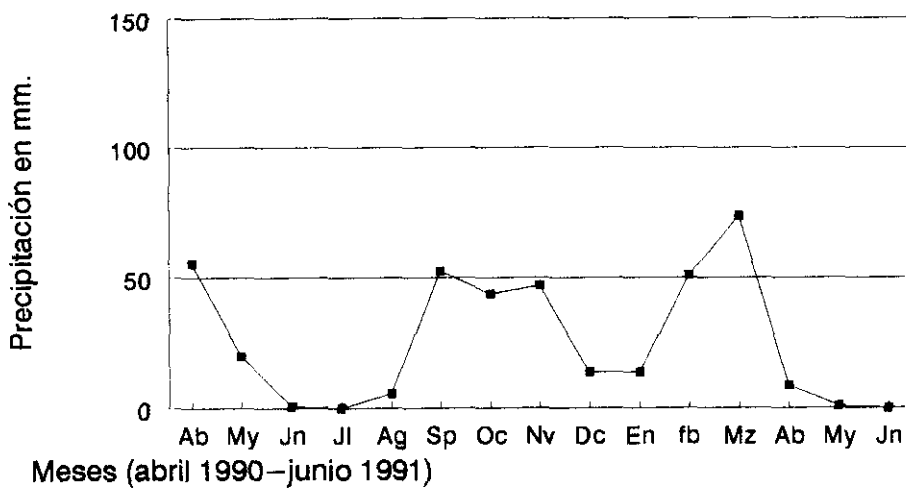


Figura 17. Datos mensuales de precipitación. La estación se localiza en el mapa de la zona, Fig. 20, con el \blacktriangle E.

PUENTE DEL ARZOBISPO (TOLEDO, nº3378)

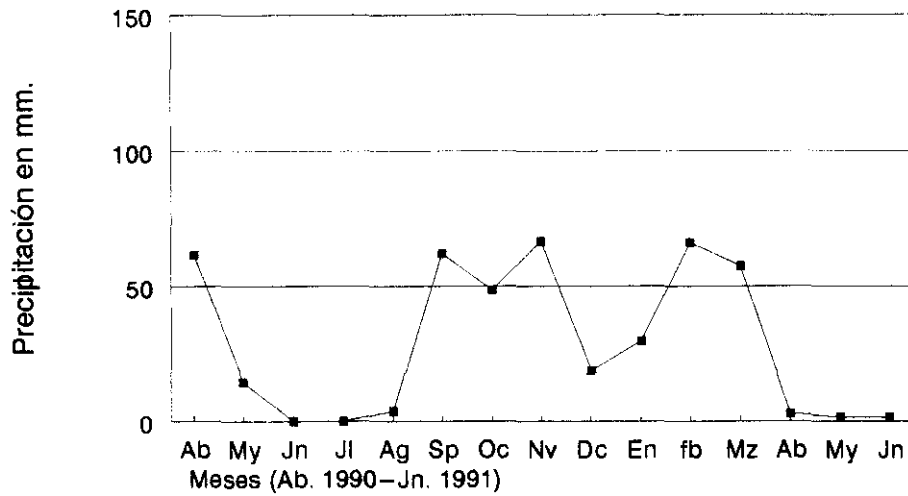


Figura 18. *Datos mensuales de precipitación. la estación se localiza en el mapa de la zona, Fig. 20, con el + F.*

FINCA EL GUARDAPERAL (CACERES, nº 3385)

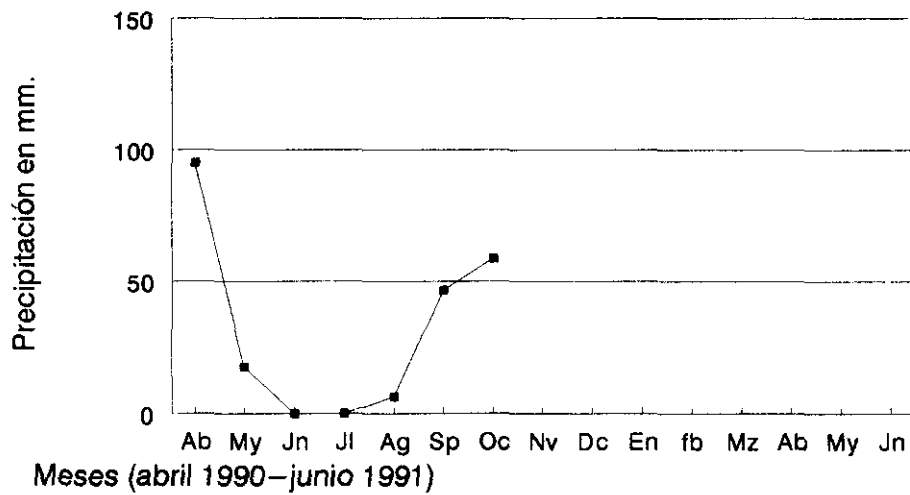


Figura 19. *Datos mensuales de precipitación. La estación se localiza en el mapa de la zona, Fig. 20, con el + G.*

2. PUNTOS DE MUESTREO: LOCALIZACION Y VERTIDOS

Se describe la localización de los puntos de muestreo (Figura 20, pág. 68), y se presenta un inventario de los vertidos que afectan a cada uno de los puntos, el cual fue realizado por la Confederación Hidrográfica del Tajo, Ministerio de Obras Públicas y Medio Ambiente en el año 1989, agradeciendo la colaboración y ayuda prestada.

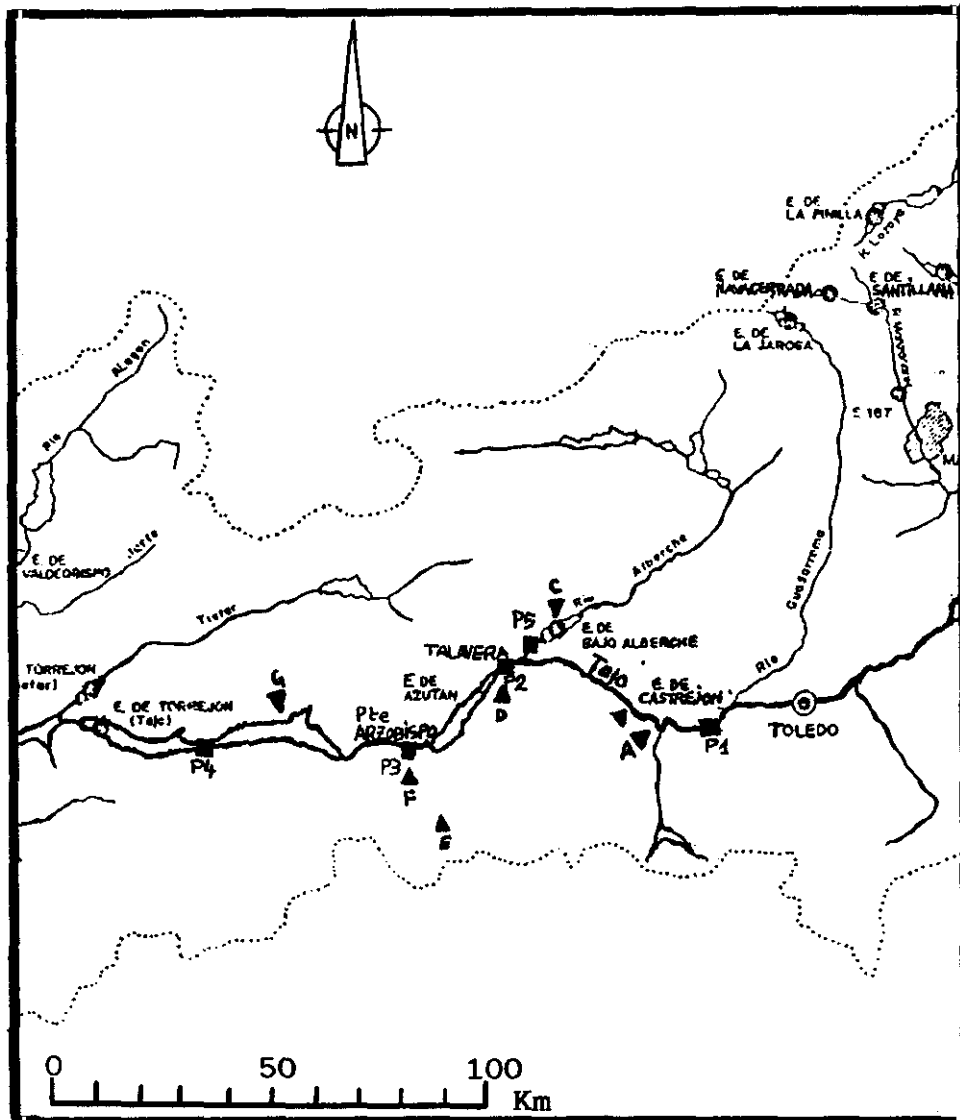
Punto 1 (P1):

Puente sobre el río Tajo, en la carretera comarcal CM 502 (Km 14.00), que va de Puebla de Montalbán a Toledo, situado 5 Km después de la desembocadura del río Guadarrama y antes del Embalse de Castrejón. Corresponde al Municipio de Carmona.

En este punto las aguas están afectadas por los vertidos directos de poblaciones importantes como Toledo y Aranjuez, (esta última aunque distante del punto de muestreo arrastrará un vertido considerable), y por los afluentes de su margen derecha: ríos Jarama y Guadarrama que a su vez recogen vertidos importantes procedentes de zonas industriales, así como por vertidos incontrolados cuya procedencia puede ser diversa.

Vertidos de Aranjuez:

Las aguas residuales urbanas y parte de las aguas industriales en este municipio se generan, principalmente, por pequeñas empresas de artes gráficas y de recubrimiento de metales, así como otras de mayor importancia dedicadas a la fabricación de maquinaria e instrumentos de seguridad, químicas etc., generándose por tanto residuos de tipo orgánico (disolventes, tintes, etc.), así como los metales que se utilizan en los decapados (aluminio, cromo, etc.), y disminuyéndose en general el pH del agua. Las aguas procedentes de estos vertidos se dirigen y se tratan en la EDAR (estación depuradora de aguas residuales) de Aranjuez, situada en el Cerro de



- Puntos de muestreo (■): P1, P2, P3, P4 y P5.
- Estaciones de pluviometría (▲):

- | | |
|---------------------------------|--|
| - A, Puebla de Montalbán | - B, Carpio de Tajo "Castrejón" |
| - C, vivero frutal de Cazalegas | - D, Cabanuelas (Talavera de la Reina) |
| - E, La Estrella | - F, El Puente del Arzobispo |
| - G, finca "El Guardalperal". | |

Figura 20. Mapa del área de estudio. Puntos de muestreo y estaciones de pluviometría.

la Linterna, mediante tratamiento secundario. Sin embargo todavía existen efluentes residuales directos al río como los de Femsa (metales), Lever Ibérica (detergentes), Fermentaciones y Síntesis Españolas S.A. (productos farmaceuticos, disolventes, materia orgánica, etc.), Robert Bosch S.A. (industria metalúrgica), Hijos de Julio de la Vega (industria de refrigeración) y por último casa Atienza S.A. (hidrocarburos).

Vertidos de Toledo:

Parte de las aguas residuales de Toledo se vierten directamente al río. Entre éstas se encuentran una población aproximada de 40.000 habitantes, un camping (generándose en ambos mayoritariamente materia orgánica y grasas), una papelera (también materia orgánica, tintes, así como el aumento de sólidos en suspensión del agua), dos fábricas de armas (metales y materia orgánica), diversas fincas ganaderas (materia orgánica y pesticidas fundamentalmente), fábricas de hidrocarburos (materia orgánica), varias graveras (sólidos en suspensión y sedimentables) y dos vertidos procedentes de la Central Térmica de Aceca (grasas e incremento de la temperatura del agua), uno de los cuales presenta un caudal medio de 5.597 m³/año, sin ningún tipo de depuración y otro de 17.308.620 m³/año, con depuración. El resto de las aguas residuales de la zona confluyen en la depuradora Benquerencia, sometiéndolas a tratamiento secundario, e ésta depuradora llegan los efluentes de una población aproximada de 12.000 habitantes y las industrias del Polígono Industrial de Toledo (en su mayoría farmacéuticas, electrónicas y pequeños talleres) generándose por tanto gran cantidad de materia orgánica, metales, grasa, detergentes, etc. Cuando se recogió la información inicial del total del volumen que llegaba a la planta, el 40% era dirigido al río por un "by pass" y el resto sufría un tratamiento primario y secundario y era vertido posteriormente al río con un caudal medio de 0,04 m³/seg. en un punto próximo al anterior. En la actualidad, la totalidad de las aguas que llegan a la depuradora son tratadas. Existen además algunos vertidos individuales que sí están sometidos a alguna forma de depuración como "Hormigones Toledo" con balsas de decantación (tratamiento secundario), ó la "Lavandería Central" con tratamiento secundario fisico-químico y una parte 3º (filtración). En ésta zona, además, existen

gran número de pequeños vertidos incontrolados.

Vertidos del río Jarama:

El río Jarama desemboca en el río Tajo tras su paso por Aranjuez, habiendo recibido la mayoría de las aguas residuales y vertidos contaminantes que se generan en la Comunidad de Madrid, con un caudal medio de 54m³/seg. Estudios de calidad de las aguas solicitados por la Confederación Hidrográfica del Tajo (Contox S.A. 1990), indican la existencia de zonas del río con determinados tipos de cargas químicas y biológicas dependiendo del tipo de vertido y características del lugar. Así por ejemplo, a lo largo del río hay cantidades variables de materia orgánica destacando con mayor carga la zona influenciada por el vertido de Fuente el Saz, posteriormente aparecen niveles elevados de sólidos en suspensión los cuales dados los valores de DQO (demanda química de oxígeno) parecen ser partículas inorgánicas (procedentes posiblemente de una estación de lavados de áridos). En zonas próximas a la desembocadura del Arroyo de la Vega y la EDAR de Arganda del Rey (tratamiento 2º físico-químico) los valores de nitritos se elevan. Además el río se va cargando de fosfatos a lo largo de su recorrido y se observan aportes significativos de detergentes especialmente en los últimos tramos del río y de cianuros próximos a la EDAR de Arganda del Rey.

Con respecto a los metales su concentración va aumentando hasta un punto entre los vertidos de la EDAR Casaquemada (tratamiento 2º) y la EDAR de Arganda del Rey, donde disminuyen posiblemente debido al efecto de dilución del río Henares. Posteriormente vuelven a elevarse las concentraciones de metales tras recibir las aguas del río Manzanares, de acuerdo con los resultados que obtiene Rovira, (1993) en su Tesis Doctoral, al realizar un estudio sobre metales pesados en las aguas y sedimentos del río Jarama. Los compuestos organofosforados no han sido detectados, por el contrario si se han detectado algunos compuestos organoclorados (PCB'S) en zonas próximas al vertido de la EDAR La Poveda (Arganda del Rey) y en áreas de la desembocadura del Arroyo de la Vega (PAH'S), aunque siempre en

niveles iguales al límite de detección. Por último los niveles de amonio en casi todas las zonas del río son elevados superando en ocasiones los límites establecidos de calidad de agua para la vida piscícola.

Vertido del río Guadarrama:

Ultimo aporte considerable al río Tajo con un caudal medio en la desembocadura de 5,32 m³/seg. Entre los vertidos directos al río destacan 2 graveras, dos industrias papeleras, 2 industrias ganaderas y las estaciones depuradoras de Guadarrama y El Endrinal, así como numerosos vertidos de arroyos a lo largo del curso del río en cuyas aguas han descargado los municipios e industrias de la zona oeste de Madrid y de la provincia de Toledo. Se detectan a lo largo de su curso (Contox S.A. 1990) concentraciones significativas de nitratos y nitritos, fosfatos, detergentes, amonio, etc., todos ellos procedentes posiblemente del Arroyo del Soto. Por otra parte, no se han detectado compuestos organoclorados, organofosforados ni PAH'S y las concentraciones de metales no varían respecto a puntos anteriores, permaneciendo en niveles normales. Dos factores pueden explicar los bajos valores de todos los metales y compuestos organoclorados analizados, junto con los niveles mínimos de materia orgánica, la existencia de sedimentos con altos valores de fracción arenosa y su localización en una zona de régimen rápido de las aguas.

Punto 2 (P2):

En este punto las aguas se recogieron en el llamado Puente Nuevo en Talavera de la Reina, situado en la Carretera Nacional CN 502 (Km 117,600) previamente al vertido más importante de Talavera de la Reina cuya influencia afectará por tanto al punto 3. Las aguas en éste vertido se vierten directamente al río a través de un emisario de reciente construcción, situado a las afueras de la población, en las proximidades de la estación Hidroeléctrica Española (Fig. 20).

El punto 2 por tanto, está sometido a una serie de vertidos individualizados y registrados muchos de ellos por el MOPU, procedentes de municipios e industrias

diversas, presentando algunos de ellos depuración. A éstas aguas además se une el aporte del río Alberche, cuya desembocadura está próxima a la ciudad de Talavera de la Reina y cuyas aguas reciben también numerosos vertidos (punto 5).

Entre los vertidos controlados por el MOPU encontramos en La Puebla de Montalbán: dos graveras, una de las cuáles tiene una balsa de decantación para su depuración y la otra no presenta depuración de ningún tipo; un restaurante con depuración mediante un tratamiento primario y un matadero con tratamiento biológico. En el municipio de el Carpio de Tajo hay un estabulario con depuración mediante balsa. En Malpica del Tajo dos 2 vertidos municipales, ambos con depuración, además de una gravera y una almazara. En el municipio de Cebolla el vertido existente es del ayuntamiento y presenta depuración mediante lagunaje. En La Pueblanueva hay dos vertidos del ayuntamiento ambos con depuración mediante oxidación total y una gravera con balsa de decantación. Parte del municipio de Cazalegas también mantiene vertidos directos al río Tajo, como el del restaurante Villarrosa el cual presenta tan solo una fosa séptica como medio de depuración. En el último tramo, antes del punto 3 se localizan diversos vertidos de pequeña entidad todos ellos pertenecientes al municipio de Talavera de la Reina (varias graveras y uno de industria ganadera). Por tanto, los vertidos que pueden afectar a las aguas en el punto 2 conllevan en general, un aporte importante de materia orgánica, sólidos en suspensión y sedimentables, detergentes, grasa, así como posible disminución del pH del agua debido al vertido procedente de la almazara, resultando ser una zona menos afectada por vertidos industriales.

Punto 3 (P3):

En el paraje situado en el puente que cruza el río, en la crta. comarcal CM 4.100 (Km 14,700) que va desde El Puente del Arzobispo a la Estrella (Municipio de Puente del Arzobispo), en la frontera con la provincia de Cáceres (Fig. 20).

Este punto está influenciado principalmente por la carga de componentes que no han podido autodepurarse del emisario principal de Talavera de la Reina (punto 2), donde se vierten las aguas residuales domésticas y de la mayoría de las industrias de esta localidad, lo que supone un caudal medio aproximado de 0,25 m³/seg. Además entre P2 y P3 existen una serie de vertidos individualizados procedentes de diversos municipios que generan aguas residuales urbanas mayoritariamente y otras procedentes de industrias agrícolas y ganaderas fundamentalmente, situadas en la Vega del Tajo, así como graveras existentes en la zona. También es importante destacar la existencia del embalse de Azután, actuando como la mayoría de los embalses como reservorio de contaminantes tanto en sus aguas como en sus sedimentos. La mayoría de los vertidos no presentan ningún tipo de depuración.

Entre los vertidos municipales se encuentran, los de Las Herencias, Azután, Alcolea de Tajo (éste con depuración mediante oxidación total) y El Puente del Arzobispo. Entre los vertidos industriales se encuentran, la gravera de Las Herencias (depuración mediante balsa de decantación), y la de Azután, Alcolea de Tajo y Añover del Tajo, todas ellas sin depuración; Además en el municipio de Azután existe una ganadería con un vertido relativamente importante de 549.600 m³/año, en el que sí existe depurado mediante balsas.

Punto 4 (P4):

Situado 50 m aguas abajo del embalse de Valdecañas, a la altura de la crta. comarcal CC 713 (Km 61.00) en el municipio de Valdeverdeja (provincia de Cáceres) (Fig. 20)

La distancia en esta ocasión con respecto al punto anterior es inferior, resultando una zona con poca actividad industrial. Entre los vertidos que se localizan en ésta zona (indicados en el inventario) destacan: dos vertidos municipales sin ningún tipo de industria, el del Ayuntamiento de Berrocalejo y el del Gordo, el primero de los cuales si presenta depuración.

Punto 5 (P5):

En el río Alberche, bajo puente situado en la crta. Nacional V, (km. 110), aproximadamente a 1 km. de la desembocadura del río en el Tajo (Municipio de Pepino) (Fig. 20).

Los vertidos fundamentalmente son de tipo urbano debido a la gran cantidad de urbanizaciones existentes en ésta zona de la sierra. Únicamente en la provincia de Toledo, y próximo al embalse de Cazalegas, se localizan vertidos de tipo industrial y ganadero (4 graveras y 3 ganaderías) sin ningún tipo de depuración excepto en una de las ganaderías.

3. PARAMETROS FISICO-QUIMICOS

El Centro Regional de Salud Pública de Talavera de la Reina, colaboró en todo momento en la determinación de los parámetros físico-químicos de las muestras de agua, para lo cual se siguió la metodología oficial, relativa a los métodos de medición y a la frecuencia de muestreo y análisis de aguas superficiales que se destinen a la producción de agua potable, Orden Ministerial del 8 de febrero de 1988 (BOE 1988b).

La Tabla 1 (pág. 75) muestra para cada uno de los puntos de muestreo, a lo largo del año, los datos de meteorología en el momento de la toma de muestras, así como las determinaciones realizadas "in situ" y en el laboratorio del Centro Regional de Salud Pública.

Todos estos datos recopilados en éste capítulo son de nuestro interés, pues nos permiten hacer una valoración de los posibles contaminantes de la zona, así como que factores pueden influir en la detección de los compuestos genotóxicos en las aguas ensayas acercándonos con ello a los objetivos de este estudio.

TABLA 1: PARAMETROS FISICO-QUIMICO DE LAS AGUAS DEL RIO TAJO RECOGIDAS EN LOS MUESTREOS

PUNTO	JUNIO 90					JULIO 90					AGOSTO 90					SEPTIEMBRE 90					
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	
METEOROLOGIA																					
T.AMBIENTE °C	29,8	25,6	27,8	29,8	32,3	29	31,3	37,4	41,3	34,2	27,2	28,5	30,5	32,5	28,8	26	23	22,8	29,2	25	
LLUVIA	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	
LLUVIA 48 H. ANTES	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	SI	NO	NO	
DETERMINACIONES																					
"IN SITU"																					
OXIG.DISMg/l	6	6,4	6,2	4,4	7,4	4,2	7,4	6	6,4	7,8	8	6,2	5,4	3,8	6,4	6,2	6,4	6,2	4,6	6,6	
T. AGUA °C	26,2	25,2	25,2	16,5	27,3	28,7	28,2	26,4	24,8	29,8	24	25,2	25,5	23	21,7	21,8	21,6	22,8	23,4	20	
PH	7,7	8,3	8,3	7,7	8,5	8,1	8,2	8,4	8,1	7,9	8,5	8,3	8,2	8,3	8,1	7,7	7,7	8,1	8,4	7,8	
CONDUCT.Mmho/cm	1900	1700	1298	667	814	1627	1404	980	572	750	1750	1900	1600	800	900	1700	1800	1550	1350	700	
TURBIDEZ UTF	45	63	24	3,6	13	20	12	4,1	1,3	3,5	57	18	13	26	20	90	20	30	4,2	13	
DETERMINACIONES																					
EN LABORATORIO																					
AMONIO mg/l.	3,87	1,08	1,03	0,81	0,49	0,98	0,38	0,1	0	0,14	0,31	0,14	0,52	1,78	0,48	4,47	0,76	1,37	0,34	0,34	
NITRATOS mg/l.	19,63	11,5	9	12,8	3,1	16,83	11,1	2,03	9,73	3,83	15,12	12,92	2,37	1,53	4,79	3,97	8,17	0,52	0	0	
FOSFATOS mg/l.	1,6	1,38	1,4	0,7	0,12	0,96	1,08	0,92	0,68	0,08	0,573	0,775	0,76	1,1	0,16	1,98	1,43	0,83	0,68	0,12	
V. PERMANG mg/l O	8,08	12,1	5,78	4,97	3,21	11,28	7,72	5,43	3,78	4,64	7,9	8,8	6,32	4,95	4,1	84,75	4,9	4,94	6,03	3,56	
OCTUBRE 90																					
NOVIEMBRE 90																					
DICIEMBRE 90																					
ENERO 91																					
PUNTO	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	
METEOROLOGIA																					
T.AMBIENTE °C	18	11,5	14,7	15,8	11,9	18,3	15	12,1	14	7	3	10,3	5,7	7,8	5	5,8	4	8,2	9,2	4	
LLUVIA	NO	SI	NO	NO	SI	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	
LLUVIA 48 H. ANTES	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	NO	NO	NO	NO	NO	SI	SI	SI	SI	SI	
DETERMINACIONES																					
"IN SITU"																					
OXIG.DISMg/l	7	7	6,2	5	7,4	8,8	7,5	6	6	7	7	7,8	7,8	6,6	7,4	7,8	7,2	7	5,2	8	
T. AGUA °C	15,2	15	17	19,8	13,9	11,5	12,9	13,2	15	9,5	7	6,7	6,8	10,2	6,1	7,2	6,4	8,2	8,1	5,2	
PH	7,8	7,6	7,9	8,1	7,9	7,8	7,9	7,5	8	8,1	7,6	7,6	7,5	7,9	7,8	8	8	8,1	8	7,8	
CONDUCT.Mmho/cm	1300	1400	1450	1250	200	1500	1500	1500	1100	400	1600	1400	1400	1150	1000	1450	1450	1400	1350	1350	
TURBIDEZ UTF	97	40	24	7,8	7,8	24	8	7,7	7	27	25	10	7,5	8,5	13	22	14	8	6,6	22	
DETERMINACIONES																					
EN LABORATORIO																					
AMONIO mg/l.	11,44	6,62	1,15	0,58	0,32	10,8	5,32	4,12	0,31	0,34	70	13	2,5	0	0,64	14,72	12,12	9,92	3,12	0,01	
NITRATOS mg/l.	9,56	16,4	19,1	10	2,89	12,1	20	20,74	16	4,83	11,75	0	5,82	13,8	11,5	9,79	18,29	17,1	18,8	10	
FOSFATOS mg/l.	2,42	2,04	1,08	0,68	0,12	2,26	1,82	1,59	0,7	0,17	2,04	18,37	1,6	0,75	0,09	2,21	2,25	1,88	1,27	0,08	
V. PERMANG mg/l O	8,24	6,73	5,49	3,9	4,64	7,66	6,45	5,64	5,91	3,25	22	7,11	5,7	4,5	2,48	8	7,23	5,17	4,72	3,27	
FEBRERO 91																					
MARZO 91																					
ABRIL 91																					
MAYO 91																					
PUNTO	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	
METEOROLOGIA																					
T.AMBIENTE °C	8,6	4,1	6,3	7,5	8,3						20,4	14	15	13,9	16,5		25	24	23	26,6	
LLUVIA	NO	NO	NO	NO	NO						NO	NO	NO	NO	NO		NO	NO	NO	NO	
LLUVIA 48 H. ANTES	NO	NO	NO	NO	NO						NO	NO	NO	NO	NO		NO	NO	NO	NO	
DETERMINACIONES																					
"IN SITU"																					
OXIG.DISMg/l	8	8	6,6	7,2	8,2						7,8	6,6	9,4	6,6	9,2		8	7,8	6,6	8,2	
T. AGUA °C	8,3	6,8	6,3	8,3	5,2						12	15,6	15,2	15,2	13,2	13,9		21,5	21	15	21,7
PH	7,8	7,8	7,8	7,7	7,8						8,1	7,9	7,7	7,7	8	8,3		8,2	8,4	7,5	8,7
CONDUCT.Mmho/cm	1450	1500	1350	1300	1300						340	950	700	650	7,9	135		1600	900	800	225
TURBIDEZ UTF	22	12	7,8	7	24						20	48	25	11	3,1	53		17	17	2,5	15
DETERMINACIONES																					
EN LABORATORIO																					
AMONIO mg/l.					0,22					0,32											
NITRATOS mg/l.					4,17					3,84											
FOSFATOS mg/l.					0,15					0,16											
V. PERMANG mg/l O																					

IV- MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIALES

1.1. Material no biológico

1.1.1. Muestras de agua

Las muestras de agua se tomaron en cuatro puntos de muestreo situados a lo largo del cauce del río Tajo, entre el puente que cruza el río, situado en el punto kilométrico 14.00 de la carretera CM 502 de la provincia de Toledo y el puente que cruza el río en el punto kilométrico 61.00 de la carretera CC 713 en el Municipio de Valdeverdesa de la provincia de Cáceres y un quinto punto situado en el río Alberche.

Los puntos de muestreo elegidos fueron aquellos que, según estudios previos de la zona (industrias, poblaciones, presencia ó ausencia de estaciones depuradoras, vertidos directos etc.) y la aparición en repetidas ocasiones de peces muertos en el del cauce río, se esperaba que fueran los de mayor índice de contaminación. Entre las causas principales de dicha contaminación se cuenta con los vertidos de poblaciones con industrias diversas como Toledo y Talavera de la Reina. Se trata de amplias zonas dedicadas a la práctica agrícola, ganadera e industrial, y los aportes de los ríos Guadarrama y Jarama que a su vez recogen vertidos de zonas industriales.

Los tres primeros puntos del cauce del río Tajo y el punto de muestreo del río Alberche están en la Comunidad Autónoma de Castilla-La Mancha, el restante, pertenece a la provincia de Cáceres. Para la recogida de muestras se contó en todo momento con la colaboración del Centro Regional de Salud Pública de Talavera de la Reina (Toledo).

La localización de los puntos, los vertidos que afectan a los diferentes puntos de muestreo, los datos de pluviosidad de la zona, así como los valores de índice de calidad de las aguas ensayadas, los cuales nos fueron proporcionados por el Centro Regional de Salud Pública de Talavera de La Reina, se describen en el capítulo III: Descripción del área de estudio.

1.1.2. Productos químicos

1.1.2.1. *Relativos a la fracción microsomal S9 mix:*

i) Para la preparación del homogeneizado de hígado de rata:

- Disolución tampón fosfato salina (Cloruro potásico 0,15 M, en tampón fosfato (5mM), pH= 7,4).

ii) Cofactores y disoluciones utilizadas para la mezcla de S-9:

- Nicotinamida-adenin-dinucleótido fosforilado 6 NADP (1 M)

- NADP.....1 g

- Agua destilada.....12,70 ml

- Glucosa-6-fosfato, (1 M)

-G-6-P.....1 g

- Agua destilada..... 3,84 ml

Ambas disoluciones se esterilizan por filtración con filtros Millipore de 0,22 μ de diámetro de poro y son suministradas por Boehringer Mannheim GmbH.

- Disolución salina:

a) - Cloruro potásico (1,65 M) 61,5 g (Merck)

b) - Cloruro magnésico (0,4M) 40,7 g (Merck)

- hasta 500 ml de agua destilada

- Disolución tampón de fosfato sódico (0,2M) (PBS):

a)- Fosfato sódico dihidrogenado (0,2 M)....13,8 g/500 ml ▶.. 60 ml (Merck)

b)- Fosfato disódico hidrogenado (0,2 M)....14,2 gr/500 ml ▶..440 ml (Merck)

Se esteriliza en autoclave 20 minutos a 121° C.

Las sales y el tampón fosfato sódico (pH = 7,4) se mantienen a 4° C, y las disoluciones de G-6P y NADP a -20 °C.

1.1.2.2. ***Mutágenos standard*** (controles positivos):

- Azida sódica (65,01 M) (Merck) 0,15 mg/10 ml de agua destilada
- 2-Aminofluoreno (Aldrich) 0,5 mg/5 ml de DMSO
- 2-Nitrofluoreno (211,22 M)(Merck) 0,01 mg/5 ml de DMSO

1.1.2.3. ***Disolventes de extracción de materia orgánica:***

- Dimetilsulfóxido (DMSO) control negativo, sin diluir (Merck)
- Acetonitrilo al 99,5% , sin diluir (Aldrich)
- Agua bidestilada (Navarro)

1.1.2.4. ***Disoluciones***

- Disolución de Histidina-Biotina 0.5mM:

Se usa en el ensayo de mutagénesis (se añade 10 ml/100 ml de top agar).

L-Histidina 24,0 mg (Merck)

D-Biotina 30,9 mg (Merck)

agua bidestilada 250 ml

La disolución se esteriliza filtrándola a través de una membrana de Millipore de 0,22 μ de poro y se guarda a 4° C en frasco ambar con tapón de rosca hasta su utilización.

- disolución de glucosa al 40%:

Glucosa anhidra $C_6H_{12}O_6$ (Merck) 40 gr

Agua bidestilada 100 ml

La disolución se esteriliza en autoclave durante 20 minutos a 121° C y se conserva a 4° C.

- disolución de Vogel-Bonner:

Se usa como componente del agar mínimo

Agua bidestilada a 45°C	670 ml
Sulfato magnésico (246,48 M)	10 gr (Merck)
Acido cítrico monohidratado (210,14 M)	100 gr (Merck)
Fosfato potásico dibásico (anhídrido) (174,18 M)	500 gr (Merck)
Fosfato dibásico de sodio y amonio (209,07 M)	175 gr (Merck)

Se ha de preparar la disolución añadiendo las sales en el orden indicado, permitiendo a cada sal disolverse antes de añadir la siguiente. Se esteriliza en autoclave 20 minutos a 121° C, y se conserva a 4° C protegida de la luz hasta su uso.

- Disolución de cristal violeta (0,1 %)

Cristal violeta	0,1g (Panreac)
Agua destilada	100 ml

1.1.2.5. *Medios de cultivo*

- Medio agar:

Es un componente de las placas de agar mínimo

Agar (Difco)	15 g
agua bidestilada	930 ml

Una vez mezclado, se lleva a ebullición para conseguir una perfecta disolución. Se esteriliza 20 minutos en autoclave a 121° C y se guarda a 4° C hasta su uso.

- Agar blando ("Top Agar"):

Se usa en los ensayos de mutagenicidad.

agar Difco	6 g
cloruro sódico (58,44 M)	5 g (Merck)
agua bidestilada	1000 ml

Se procede igual que en el caso anterior, conservándose en volúmenes de 100 ml hasta su utilización.

- Agar nutritivo:

Nutrient Broth n° 2 (Oxoid) 25 g
agua bidestilada 1000 ml

Se prepara en un matraz y se lleva a ebullición 3 veces. Se esteriliza en autoclave 20 minutos a 121° C. Se distribuye en placas petri en alícuotas de 20 ml (placas de agar nutritivo). Se utilizan para verificar las características genotípicas de las cepas

- Medio de agar glucosado (agar mínimo):

Agar 15 g
Agua destilada 930 ml
Disolución Vogel-Bonner 20 ml
Disolución Glucosa al 40% 50 ml

El medio agar se licúa calentándolo y a continuación se añaden con pipeta y en campana de flujo laminar los demás componentes. Se agita bien, se deja reposar durante 4 ó 5 minutos con el fin de que desaparezcan las burbujas y se distribuye la disolución en placas petri en alícuotas de 20 ml (placas de agar glucosado). Placas utilizadas en el ensayo de mutagénesis

- Medio histidia-biotina:

- Se añade a los componentes del medio de agar glucosado:
- disolución estéril de histidina (2 g/400ml de agua destilada) 10 ml
- Biotina estéril (0,5 mM) 6 ml

Se procede de igual forma que con el agar glucosado, para obtener las placas de histidia\biotina.

- Medio de ampicilina:

- Se añade a los componentes del medio histidia\biotina:
- Disolución de ampicilina estéril (8mg/ml 0,02N de hidróx. sódico).. 3,15ml

Se procede de forma similar a los dos medios anteriores, para obtener las placas de ampicilina.

- Caldo nutritivo ó medio de crecimiento bacteriano para obtener el cultivo de noche:

Nutrient Broth n° 2 (Oxoid) 25 gr

agua bidestilada 1000 ml.

Se disuelve (no es necesario hervir) y se reparte en frascos de 25ml a razón de 9 ml/frasco. Se esteriliza en autoclave a 121°C, durante 20 minutos y se conserva a 4°C hasta su utilización.

1.1.3. Material desechable

- Mini-columnas cromatográficas C₁₈ Waters-Millipore)
- Criotubos Nunc (1,8 ml)
- Placas Petri de 100 mm de diámetro (Soria Greiner)
- Tubos estériles de 16 por 100
- Jeringas estériles de un solo uso
- Filtros Universal Supelco 0,45 µm de poro y 47mm de diámetro
- Filtros Millipore 0,22 µ de poro

1.2. Material biológico

1.2.1. Cepas bacterianas

Se han utilizado cepas mutadas de *Salmonella typhimurium* denominadas

TA 1535

TA 100

TA 1538

TA 98,

facilitadas por el Dr. Bruce N. Ames del Departamento de Bioquímica, Universidad de Berkeley (California) (recomendadas para ensayos generales de mutagenicidad).

Características genéticas de las cepas: Todas las cepas derivan de *Salmonella*

typhimurium LT2 (Ames y col. 1975). Hay varios tipos de células bacterianas estandar que se utilizan en el ensayo de Ames, diferenciándose por las distintas mutaciones existentes en el operón de la histidina (Maron y Ames, 1983) (Figura 21). Todas estas cepas son autotrófas para la histidina, requieren por tanto histidina adicional en el medio de cultivo.

Los genes implicados en la biosíntesis de la histidina son nueve, intimamente ligados y ordenados de la "A" a la "H", afectando cada uno de ellos a una enzima distinta de la vía de síntesis, excepto el gen "B" que afecta a dos enzimas diferentes. En el mapa genético los genes están en el orden indicado en la figura 1, siguiendo en su mayor parte la secuencia metabólica de la histidina, con la excepción del último gen "G", el cual controla el primer enzima, la pirofosforilasa.

Las mutaciones básicas en el operón de la histidina de las cepas mutantes utilizadas son:

His G46: Característica de las cepas TA 1535 y TA 100. Se encuentra en el gen his-G que codifica para el primer enzima de la biosíntesis de la histidina. Esta mutación consiste en una sustitución del par de bases A-T existente en el tipo salvaje, por el G-C.

<u>Tipo salvaje</u>	<u>Mutación his G46</u>
-G <u>A</u> G- (leucina)	-G <u>G</u> G- (prolina)
-C <u>T</u> C-	-C <u>C</u> C-

Dichas cepas pueden utilizarse para detectar mutágenos que causan sustitución de pares de bases G-C, como los agentes alquilantes, la 2-aminopurina y la mostaza nitrogenada.

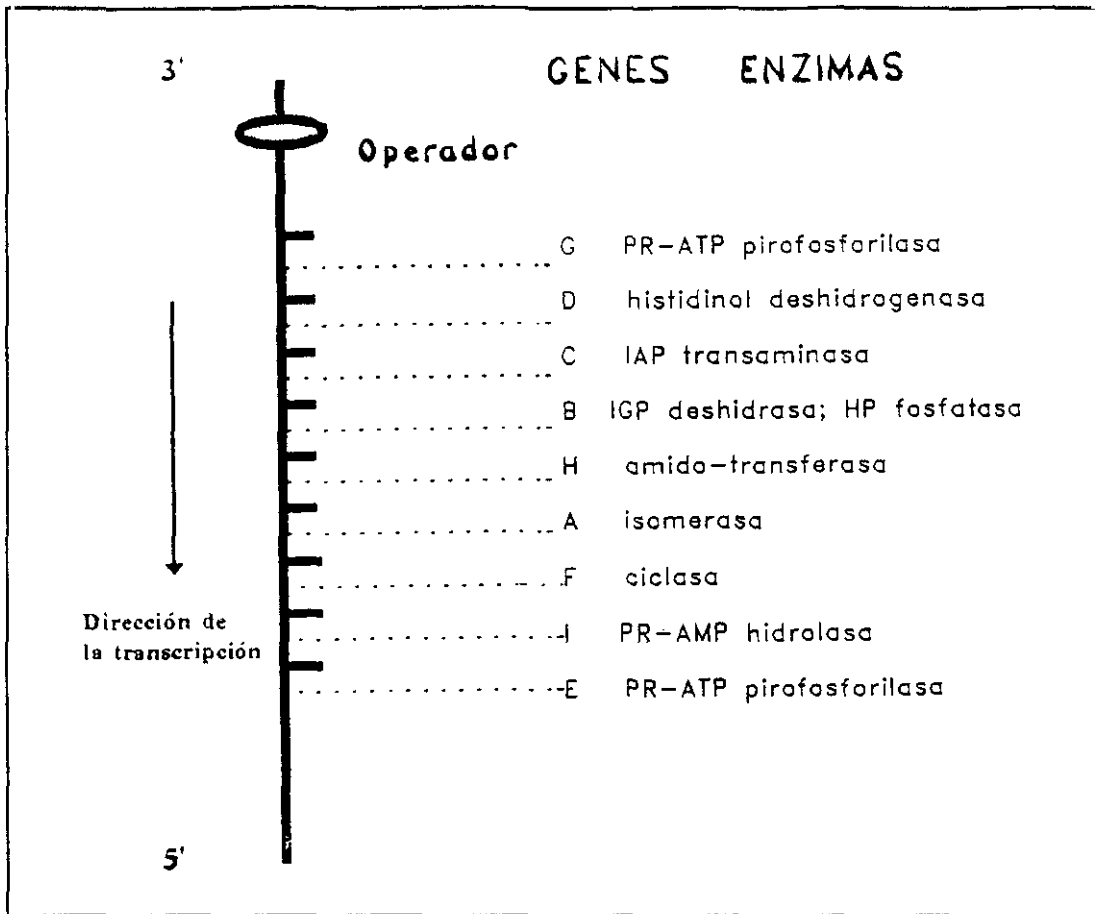


Figura 21: Mapa de los nueve genes (A-I) del operón his

His D3052: Característica de las cepas TA 1538 y TA98. Se encuentra en el gen his-D que codifica para la histidinol deshidrogenasa. Esta mutación es de tipo "frameshift" (desplazamiento de lectura del DNA) y consiste en una adición de dos pares de bases próxima a una cadena de ocho restos de -CG- repetidos. Estas cepas responden a mutágenos que delecionan ó adicionan dos pares de bases adyacentes en regiones del DNA que poseen secuencias de bases repetidas en tandem, de forma que queda restaurado el marco de lectura original.

Las cepas utilizadas además de poseer estas mutaciones básicas presentan mutaciones adicionales que aumentan su eficacia para detectar mutágenos:

i) uvrB: Afecta los sistemas de reparación. Causa la delección de un gen que codifica el sistema de escisión para reparar la molécula de DNA, por tanto, su eliminación implica la desaparición de este mecanismo de reparación en las cepas mutantes, dotándolas de un aumento de la sensibilidad para detectar muchos agentes mutagénicos. Por razones de proximidad esta delección se extiende al gen que codifica la síntesis de la biotina (bio gen) y como consecuencia estas cepas necesitan biotina para su crecimiento.

ii) rfa: Mutación que causa la pérdida parcial de la barrera liposacárida de la pared bacteriana, aumentando la permeabilidad a moléculas voluminosas como el benzo-(a)-pireno ó el cristal violeta que no atraviesan las paredes celulares normales.

iii) Unicamente las cepas TA 98 y TA 100 poseen el plásmido factor R (pKM101), el cual les confiere resistencia a la ampicilina y aumenta su mutación espontánea e inducida al incrementar los errores en el sistema de reparación de estos organismos. Así, estas cepas con factor R revierten mas fácilmente que las cepas que carecen de este factor detectándose mejor los factores mutagénicos.

1.2.1.1. *Salmonella typhimurium cepa TA 1535*

Es un mutante his⁻ G46 (pág. 83). Se utiliza para detectar mutágenos que producen sustituciones de pares de bases, como son los agentes alquilantes. Por otra parte es una cepa deficiente en el mecanismo de reparación por escisión (uvrB), y tiene aumentada la permeabilidad a macromoléculas (rfa) (Tabla 2, pág. 87).

1.2.1.2. *Salmonella typhimurium cepa TA 1538*

Es un mutante his⁻ D3052 (pág. 84). Se utilizan para detectar mutágenos que adicionan ó deleccionan pares de bases adyacentes, situadas en una zona próxima a la mutación que posea una secuencia repetitiva -C-G-C-G-C-G-, de forma que queda restaurada la correcta lectura del fragmento de DNA para la síntesis de la histidina.

Se trata por tanto de una mutación "frameshift" (una base es añadida o deleccionada, causando un desplazamiento en el marco de lectura o desfase genético).

1.2.1.3. *Salmonella typhimurium cepa 98*

Es un mutante D3052, con las mismas características genotípicas de la cepa TA 1538 de la que deriva, a excepción de la presencia del plásmidio PKM101 (factor R), que le confiere resistencia a la ampicilina y aumenta la probabilidad de error durante la duplicación del ADN (pág. 85). También es por tanto un mutante sensible a los mutágenos "frameshift" teniendo sensiblemente aumentada su capacidad para revertir.

1.2.1.4. *Salmonella typhimurium cepa 100*

Es un mutante G46 de la cepa TA 1535 que a diferencia de ésta, posee el plásmido PKM101 (factor R). Es una cepa sensible a los mutágenos que causan sustituciones de bases, aumentando en ocasiones la capacidad para revertir.

1.2.2. **Ratas para la obtención de la fracción microsomal de hígado, S9**

Para obtener la fracción microsomal S9 de hígado de rata, se utilizaron ratas machos Wistar, de aproximadamente 200 g. suministradas por el Departamento de Farmacología y Toxicología de la F. de Veterinaria de Madrid U.C., fueron mantenidas con pienso y agua "ad libitum" hasta 16 horas antes del sacrificio. Para incrementar la actividad metabólica de esta fracción microsomal se tratan las ratas durante los cinco días previos al sacrificio con el inductor enzimático Aroclor 1254 (diluido en aceite de maíz y a la concentración de 200 mg/ml).

Tabla 2. Genotipos de las cepas bacterianas *Salmonella typhimurium*

CEPA	MUTACIONES BASICAS	MUTACIONES ADICIONALES		
	<u>Operón histidina</u> (efecto)	<u>Sistema de reparación</u>	<u>Pared bacteriana</u>	<u>Plásmido</u>
TA 1535	<u>his G46</u> : sustituye (G-C) ▶ (A-T)	uvrB	rfa	
TA 1538	<u>his D3052</u> : desplaza la lectura que afecta a pares de bases (G-C)	uvrB	rfa	
TA 98	<u>his D3052</u> : desplaza la lectura que afecta a pares de bases (G-C)	uvrB	rfa	pkM101
TA 100	<u>his G46</u> : sustituye (G-C) ▶ (A-T)	uvrB	rfa	pkM101

2. METODOS

2.1 Tratamiento de las muestras

2.1.1 Recogida de muestras

El muestreo de todos los puntos antes referidos (Pág. 77) se realizó mensualmente desde Junio de 1990 a Mayo de 1991 (12 muestreos).

Para efectuar las tomas, se siguió la metodología oficial relativa a los métodos de medición y a la frecuencia de muestreo y análisis de aguas superficiales que se destinen a la producción de agua potable, recogida en la Orden Ministerial de 8 de Febrero de 1988, (BOE 1988b).

La toma de muestras es una operación delicada, y precisa que debe ser llevada a cabo con el mayor cuidado, ya que condiciona los resultados analíticos y la interpretación de los mismos. El objetivo fundamental es conseguir una muestra de agua homogénea y representativa para poder determinar, a partir de ella, las características físicas y químicas de la masa de agua.

El muestreo se realizó sumergiendo la botella de tomas, previamente enjuagada con el agua del río, en el punto considerado a una cierta distancia del fondo y de las orillas, evitando poner en suspensión los depósitos sedimentados. De cada punto se recogieron 20 litros de agua y se determinó "in situ" la temperatura y el pH, e igualmente se consideraron las características organolépticas de las aguas.

Una vez recogida la muestra y homogeneizada, fue separada en submuestras de distintos volúmenes según los parámetros a analizar en cada caso y almacenadas en botellas de cristal ámbar, siendo tratadas individualmente para su conservación hasta el momento de su utilización. Con ello, se pretendió retardar tanto la acción biológica

de los microorganismos presentes como la hidrólisis de los compuestos químicos, y reducir la volatilidad de los constituyentes. En todo momento se intentó, que el tiempo entre la recogida de la muestra y su análisis fuese el menor posible.

Estas muestras de agua se utilizaron para la realización de los ensayos de mutagénesis llevados a cabo en nuestro laboratorio y para la determinación de los parámetros físico-químicos, estos últimos realizados por el personal del Centro Regional de Salud Pública de Talavera de la Reina (Tablas 1, pág. 75).

Nosotros vamos a indicar el procedimiento seguido para la submuestra de las aguas utilizadas en los ensayos de mutagénesis, para los que se recogieron 12 litros de agua por punto de muestreo y mes, en bidones de cristal ámbar estériles y se mantuvieron a 4°C hasta su procesamiento, el cual se realizó a la mayor brevedad dada la inestabilidad de parte de los posibles compuestos contaminantes a ensayar contenidos en las muestras. El transporte del agua a nuestro laboratorio se hizo en camiones refrigerados a la temperatura adecuada.

2.1.2. Concentración de la materia orgánica del agua

Todas las muestras de agua indicadas en el apartado anterior y en nuestro laboratorio fueron sometidas a tratamiento físico-químico con el fin de concentrar los disolventes orgánicos que pudieran contener, buscando con ello obtener los mejores resultados en los ensayos bacterianos.

En primer lugar se pasa el agua por un prefiltro, para eliminar las partículas de mayor tamaño como arenas, algas, etc.

Posteriormente la materia orgánica disuelta en el agua se extrae mediante cromatografía en fase sólida (WolKoff y cols.; 1981), para ello el método elegido fué el Sistema Sep-Pak o cartuchos C₁₈ (Waters-Millipore).

El Sep-Pak es un dispositivo fabricado por Water Associates Inc, que podría definirse como una técnica perfeccionada de la cromatografía de adsorción en columna. El cartucho de Sep-Pak, se acopla a una bomba de agua, ó simplemente a una jeringa, pasando así la muestra y los eluyentes con cierta presión.

De entre los diferentes cartuchos Sep-pak, se ha empleado el C₁₈ Cartridge, diseñado especialmente para muestras disueltas en agua con contenido en materia orgánica. En cuanto a las características físico-químicas de los cartuchos, hay que señalar que el cartucho C₁₈, contiene 0,4 gr del sorbente "octodecylsilane", constituido por partículas de entre 55-105 milimicras de tamaño y con poros de 125Å, siendo la superficie de baja polaridad ó hidrofóbica. Los diferentes sorbentes cromatográficos de la matriz con selectividades químicas distintas, retienen la materia orgánica por la mayor afinidad que muestran hacia ellos, que por la fase móvil acuosa en la que van disueltos los compuestos orgánicos. Cada cartucho tiene una capacidad de retención que abarca desde 1-2 miligramos hasta 100 miligramos, dependiendo del tipo de compuesto. En ningún caso se recomienda pasar más de 1000-1500 ml de agua a través de un solo cartucho, para evitar la hidrólisis del sorbente.

Los cartuchos o mini-columnas cromatográficas, previamente a su utilización, tienen que ser activadas, para ello se emplean 2 ml. de disolvente polar (acetonitrilo) y se lavan con 5 ml. de agua bidestilada.

El paso de agua a través de las columnas se realiza mediante una bomba peristáltica "Millipore" a la velocidad de 100ml/min. La materia orgánica presente en el agua se queda retenida en la mini-columna (de la cabeza a cola) de menor a mayor polaridad, puesto que el material de relleno es de baja polaridad.

Posteriormente se procede a la elución ó extracción de los compuestos retenidos en la columna, esto se consigue modificando la fase móvil al incrementar su contenido orgánico mediante un gradiente de disolventes (eluyendose selectivamente los compuestos orgánicos). En nuestro caso se utilizan mezclas de disolvente/agua de

mayor polaridad a menor polaridad:

- 1º fracción: 8 ml de agua/2 ml de acetonitrilo
- 2º fracción: 2 ml de agua/8 ml de acetonitrilo

Para evaporar el disolvente de las distintas fracciones recogidas por separado se utiliza un Rota-Vapor con el agua a la temperatura de 45°C y conectado a una bomba de vacío. El agua presente en el concentrado de la muestra se elimina mediante un liofilizador. El residuo seco se disuelve en 10 ml de DMSO y se guarda en el congelador, protegido de la luz, hasta su utilización.

De las distintas fracciones disueltas en DMSO, obtenemos tres extractos de las muestras problemas (Fr.):

- 1º muestra: de mayor polaridad 8 agua/2 acetonitrilo
- 2º muestra: de menor polaridad 2 agua/8 acetonitrilo
- 3º muestra: mezcla de las dos muestras anteriores tomadas a partes iguales.

Las 1ªFr de las muestras, son muestras polares con pH neutro y contiene en general sustancias hidrofílicas.

Las 2ªFr de las muestras, tienen pH 4 (ácido débil), y las sustancias eluidas son afines a disolventes moderadamente polares.

Las 3ªFr de las muestras, tienen características intermedias de las fracciones anteriores tanto en pH como en afinidad al agua.

El índice de polaridad de los disolventes tiene una amplitud de 0-9 (Snyder, 1974), en el que el valor 9 corresponde al agua, que es el disolvente más polar que existe. El acetonitrilo ocupa el valor 6,2 al igual que el ácido acético, es por lo tanto un disolvente moderadamente polar, muy volátil, soluble en agua, y con gran poder de reacción con muchos compuestos químicos. Presenta miscibilidad selectiva con muchos compuestos orgánicos (Clayton y Clayton, 1982), siendo inmisible con muchos hidrocarburos saturados (Budavari, 1989). Debido a parte de sus características, el acetonitrilo se emplea en la industria y en los laboratorios en la

extracción de materia orgánica, ácidos grasos, aceites animales y vegetales, derivados del petróleo, fibras sintéticas, colorantes, alquitránes, etc. El acetonitrilo es fácilmente biodegradable por gran cantidad de bacterias del agua, su hidrólisis en agua es muy lenta y su fotodegradación tanto en el agua como en la atmósfera es poco significativa. En cuanto a la mutagenicidad hay varios trabajos que indican que el acetonitrilo no muestra mutagenicidad hacia *Salmonella typhimurium* en las cepas TA1535, TA1538, TA98 y TA100 (Mortelmans y col. 1986 y Schlegelmilch y col. 1988). Su toxicidad es baja para los microorganismos, pero existen datos sustanciales de sucesos ocurridos en hombres que hacen pensar que el acetonitrilo tiene efectos tóxicos sistémicos a través de su transformación metabólica en cianuro, catalizada por el sistema de la citocromo-P-450-monooxigenasa (IPCS 1993). .

2.1.3. Preparación de las muestras

Las muestras problemas previamente al ensayo de mutagénesis, deben ser filtradas por membrana universal Supelco con poro de 0,45 μ m y 47 mm de diámetro, para garantizar la esterilidad.

2.2. Obtención de la fracción microsomal S9

2.2.1. Tratamiento de los animales: inducción enzimática

Se administra a las ratas, vía intraperitoneal el inductor enzimático Aroclor 1254, cinco días antes a su sacrificio. La dosis utilizada es de 500 mg/Kg de peso.

2.2.2 Obtención del homogeneizado de hígado de rata

Se basa en el procedimiento seguido por Garner y col. (1972); todos los pasos seguidos se desarrollan entre los 0 °C y los 4 °C y las disoluciones y el material empleado está estéril para evitar degradación de la muestra.

Se sacrifican los animales por dislocación cervical, se extraen los hígados (aproximadamente 12 gramos) y se procede a la obtención de la fracción microsomal S9 de los animales sacrificados previamente por dislocación cervical. La muestra de hígado se coloca en un vaso de precipitado, enfriado con hielo, donde se desmenuza con tijeras estériles y se lavan con disolución tampón fosfato salina (KCl 0,15 M en tampón fosfato 5mM a pH=7,4). Posteriormente se añaden 3 ml. de la misma disolución por gramo de hígado y se homogeneiza en un homogenizador Polter Elvehjen con émbolo de teflón. El homogeneizado se centrifuga a 4 °C durante 20 minutos a 9.000xG (7822 rpm en una ultracentrífuga JA 14 Beckman). El sobrenadante que contiene los microsomas, se decanta y es lo que se denomina fracción S9.

Las fracciones S9 se distribuyen en alíquotas de 2 ml. en tubos de plástico estériles (cryotubes Nunc). Se almacenan en nitrógeno líquido a -180°C hasta su utilización.

La concentración de proteínas de la fracción S9 se determinó por el método de Lowry y col. (1951) siendo de 28,25 mg/ml.

2.2.3. Fracción S9-mix

La disolución se prepara inmediatamente antes del ensayo de genotoxicidad. En un frasco esteril se vierten por orden, los siguientes componentes:

- * vial de S-9 a temperatura ambiente 2 ml
- * cofactor NADP (4 mM) 2 ml
- * cofactor glucosa 6-fosfato (5 mM)..... 0,25 ml
- * disolución salina de: MgCl₂(8 mM) + KCl(33 mM) 1 ml
- * tampón fosfato sódico (0,1 M; pH=7,4) 25 ml
- * agua bidestilada esteril 19,75 ml

Todas las disoluciones utilizadas para la mezcla S9 se han preparado con anterioridad como se indica en el apartado 1.1.2.(pág 78). La actividad S9-mix se mantiene en hielo durante unas horas.

2.3 Métodos de procesamiento de las cepas bacterianas

2.3.1 Obtención y conservación de las cepas

Las cepas suministradas en envases de plástico contenían un disco de papel de filtro impregnado con el cultivo bacteriano de la cepa correspondiente y rodeado por agar blando para impedir su desecación. Se utilizaron distintos procedimientos de conservación de las cepas y se almacenaron en sitios diferentes, en prevención de que alguno de los sistemas de mantenimiento fallara. Las cepas microbianas utilizadas no eran las salvajes, sino que tenían mutaciones específicas para aumentar la sensibilidad de detección de mutaciones posteriores (Mat. y Mét. pág. 82). Por tanto, son cepas no estables, y los métodos de almacenaje convencionales en microbiología no son los más adecuados.

a) Cultivos permanentes (congelados):

Tras la recepción de las cepas se procedió inmediatamente a efectuar un cultivo bacteriano, parte del cual se destinó a la obtención de los "cultivos permanentes" que se conservan congelados y se utilizaron como fuente de inóculo para los cultivos líquidos denominados "cultivos de noche" de los ensayos de mutagenicidad. Con la otra parte del cultivo se realizó un control inmediato para verificar las características genotípicas de las cepas (Mat. y Mét. pág. 96). Para conseguir los cultivos "permanentes" se procedió de la siguiente manera: Se introdujo cada uno de los discos con el inóculo de la cepa correspondiente, en frascos estériles con 100 ml del caldo nutritivo, y se incubó a 37 °C en un baño de agua con agitación, manteniéndolo en oscuridad durante 14-16 horas. Parte del cultivo, como hemos comentado anteriormente, se repartió en alícuotas de 2 ml en tubos estériles Nunc, conteniendo 0,09 ml de DMSO (agente crioprotector) por cada ml de cultivo, los cuales, se

etiquetaron indicando cepa y fecha de preparación, y se mantuvieron en hielo, hasta que se introdujeron en nitrógeno líquido (-180 °C) hasta su utilización (se recomienda su uso antes de 2 años de almacenaje), constituyendo los "cultivos permanentes congelados".

b) Cultivos líquidos: (cultivos de noche)

Los denominados cultivos de noche se emplean, como ya hemos comentado, como fuente de inóculo, en los ensayos de mutagénesis. Estos cultivos deben utilizarse en el estadio inicial de la fase estacionaria ya que el estado fisiológico de la bacteria es un factor clave para la reproducibilidad de los ensayos.

Se toman dos inóculos del orden de 10^7 - 10^8 bacterias de cada una de las cepas con las que se va a realizar el ensayo de mutagénesis y se añaden a dos frascos de 250 ml estériles con 5 ml de caldo nutritivo (se preparan otros dos frascos sin inóculo que servirán de controles negativos). Se incuban los frascos en baño de agua con agitación, a 37° C en oscuridad durante 14 horas. Una vez obtenidos, los cultivos se conservan a 4° C, hasta el momento de la siembra.

2.3.2. **Regeneración**

En caso necesario se pueden regenerar las cepas bacterianas, a partir de un cultivo permanente congelado. Es conveniente reaislar las cepas a fin de mantener la frecuencia de reversión característica de las mismas. Para ello se aplica una gota de cultivo bacteriano sobre la superficie de una placa de agar mínimo enriquecido con histidina y biotina, las placas que se van a utilizar para las cepas con factor-R, además, se añade ampicilina (TA 98 y TA 100). Se hacen estrías sobre la placa para obtener colonias aisladas y se incuban a 37°C, 48h. Posteriormente con un asa de siembra se extrae una colonia y se suspende en 0,3 ml de PBS esteril (Mát. y Mét. pág. 78), obteniendo un cultivo líquido a partir de los cuales se prepararán nuevos cultivos permanentes.

2.3.3. Curvas de crecimiento

Sirven para establecer el periodo de incubación óptimo de los cultivos bacterianos, lo que nos permite plaquear el máximo número de bacterias y en la fase de crecimiento más apropiada para la realización del ensayo de mutagenicidad.

Para determinar las cinéticas de crecimiento bacteriano de las cepas TA 1535, TA 1538, TA 98 y TA 100), se inoculan 0,5 ml de un cultivo bacteriano permanente en 50 ml de medio de crecimiento, y se incuba a 37 °C en baño de agua con agitación, en oscuridad y durante 14 horas. A tiempo 0 y a distintos intervalos, se extraen alícuotas de 3 ml, y se determina su concentración bacteriana por turbidimetría, usando un espectrofotómetro a la longitud de onda de 650 nm. Así se analiza la cinética de crecimiento de cada cepa y se ha podido comprobar que tras 14 horas de incubación las cepas se encuentran iniciando la fase de crecimiento estacionario.

2.3.4. Verificación de las características genotípicas de las cepas

Esta verificación se realiza según el protocolo establecido por Maron y Ames (1983). Es esencial ratificar periódicamente que las características genotípicas de las cepas (concentración celular, frecuencia de reversión espontánea, genotipo y respuesta a mutágenos conocidos) no han sufrido modificaciones.

El control de las cepas bacterianas se realiza:

- i) Inmediatamente después de recibir las cepas.
- ii) Cuando se preparan congelados permanentes.
- iii) Cuando el número de revertantes espontáneos de la cepa no es el esperado.
- iv) Cuando hay pérdida de sensibilidad a los mutágenos estandar.

Para estos tests, como para todos los ensayos, deben utilizarse cultivos frescos y materiales esterilizados.

2.3.4.1. *Concentración celular*

Para analizar la concentración celular, los cultivos en fase estacionaria se diluyen de forma seriada (1:10) con tampón salino o caldo nutritivo, agitando bien para evitar la agregación celular. Se vierten 0,1 ml de la dilución 10^{-6} sobre placas de agar nutritivo vehiculado en 2 ml de agar blando de superficie. Las placas se incuban 24h en estufa a 37°C, y se cuentan las colonias. Si el inóculo es correcto deberán existir de 100-200 colonias/placa.

2.3.4.2. *Requerimiento de histidina*

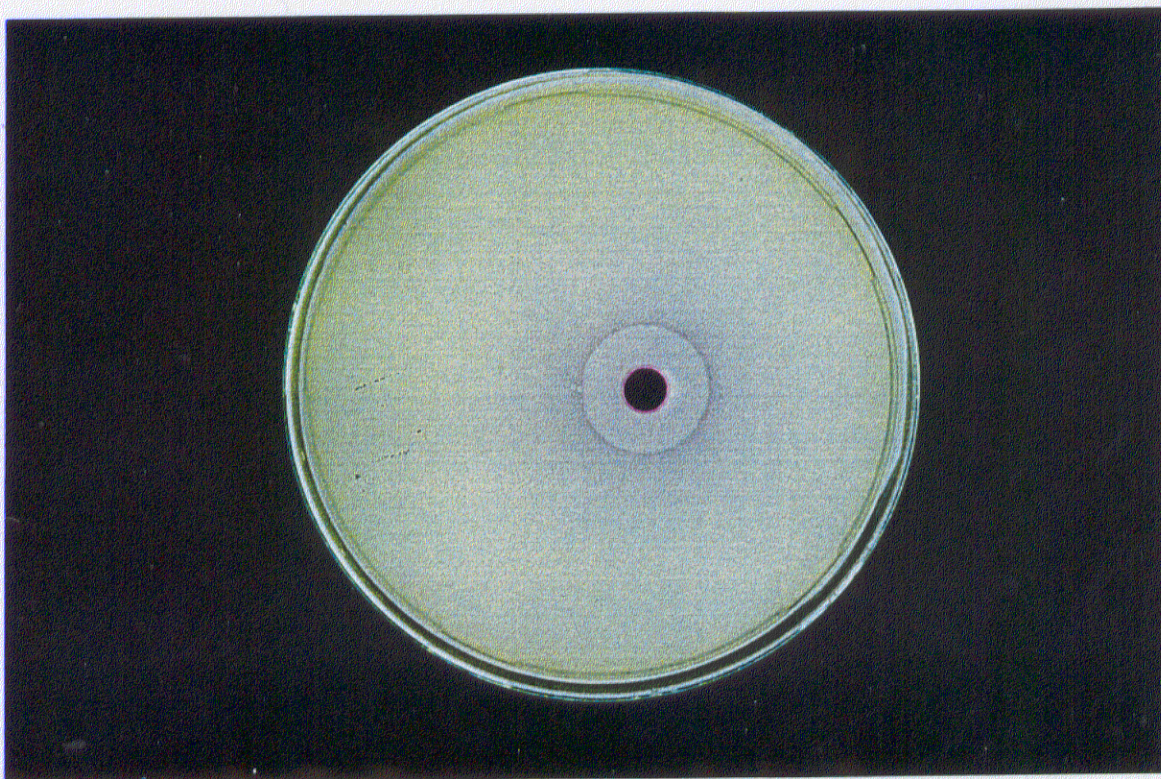
La comprobación del requerimiento de histidina se hace para confirmar el carácter auxotrófico *his* de las cepas bacterianas. Se preparan placas de agar glucosado, y se les añade, a unas disolución histidina-biotina, y a otras solo biotina. Se siembran ambos tipos de placas y se incuban a 37 °C durante 24 h. Si la cepa no ha revertido su mutación *his* (carácter *his*⁻), solo deberá aparecer crecimiento en las placas con histidina-biotina.

Las cepas utilizadas en este trabajo son asimismo autotróficas para biotina, ya que la delección *uvrB* incluye genes de la ruta de la biotina (Materiales, apart. 1.2.1., pág. 85), pero no es necesario confirmar el requerimiento porque, en este caso, la mutación implicada no revierte espontáneamente.

2.3.4.3. *Sensibilidad al cristal violeta*

Esta prueba se realiza para comprobar la presencia en la cepa de la mutación *rfa* (Materiales, pág.85 y Fotografía 1) . En placas de agar nutritivo se vierten 0,1 ml del cultivo de noche vehiculado en 2 ml de agar blando. Se coloca en el centro de las

placas un disco de papel de filtro impregnado con disolución de cristal violeta (1 mg/ml), y se incuban a 37 °C durante 24 horas, tras lo cual debe aparecer un halo de inhibición de crecimiento alrededor del disco, si existe la mutación (no ha revertido). Esta mutación permite la entrada en las bacterias de grandes moléculas, tales como el cristal violeta, lo que les ocasiona la muerte.



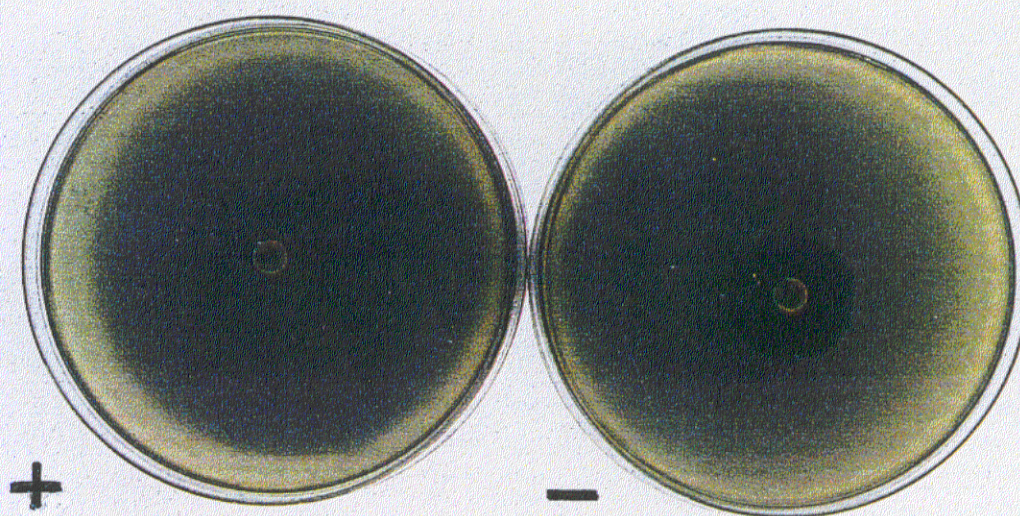
Fotografía 1. Control de la mutación *rfa*: sensibilidad al cristal violeta.

2.3.4.4. *Sensibilidad a la luz ultravioleta*

Se realiza para confirmar la existencia de la mutación *uvrB* (Materiales, pág. 85). En placas de agar nutritivo se siembra una muestra del cultivo a chequear en forma de estrías paralelas. Se cubre la mitad de la placa y se irradia con una lámpara de luz ultravioleta de 15 W, a una distancia de 33 cm, durante 6 segundos en las cepas TA 1535 y TA 1538, y durante 8 segundos en las cepas TA 98 y TA 100. Se incuban las placas a 37 °C durante 24 horas. Las cepas con la delección *uvrB* crecerán sólo en el lado no irradiado de la placa.

2.3.4.5. *Resistencia a la ampicilina*

La resistencia a la ampicilina permite confirmar la presencia en las bacterias del Factor R (plasmido pKM101), que confiere **resistencia a ampicilina en las cepas TA 98, TA 100** (Fotografía 2, Materiales, pág. 85). Estas cepas se chequean de forma rutinaria, debido a que el plásmido es bastante inestable y se pierde con facilidad. El ensayo se realiza utilizando discos de papel de filtro impregnados en una disolución de ampicilina, siguiendo el método descrito para la detección de la mutación rfa (Pág. 98) observando que la ausencia de zonas de inhibición alrededor del disco indica resistencia a la ampicilina.



Fotografía 2. Control de la mutación factor R: resistencia a la ampicilina (+), no resistencia a la ampicilina (-).

2.3.4.6 *Mutación espontánea*

Existen unos intervalos estandar de reversión espontánea para cada una de las cepas mutantes utilizadas (Materiales, pág. 100) y un ensayo experimental solo será aceptable si los valores del control negativo están dentro del intervalo característico de cada cepa ensayada (Fotografía 3; Tabla 3; Maron y Ames, 1983).

Para que se produzca la mutación espontánea es necesario un crecimiento bacteriano mínimo (replicación del DNA), debido a lo cual se añaden trazas de histidina-biotina (0,1 ml de 0,1 M de histidina y 0,1 ml de 0,5 mM de biotina) al "agar blando" (pág. 80). La reversión espontánea de cada una de estas cepas no dependientes de histidina, se expresa según el número de colonias revertidas espontáneamente por placa, y es característica de cada una de ellas. Las colonias revertidas son claramente visibles, ya que se asientan sobre un fondo opaco o lecho bacteriano que corresponde al crecimiento de las bacterias auxotrófas el cual se hace posible debido a la histidina añadida. La presencia del lecho bacteriano es esencial en los ensayos de mutagénesis, pues es un indicador de inhibición del crecimiento bacteriano causado por los productos químicos ensayados.

Tabla 3. Mutación espontánea (* De Serres y Shelby, 1979)

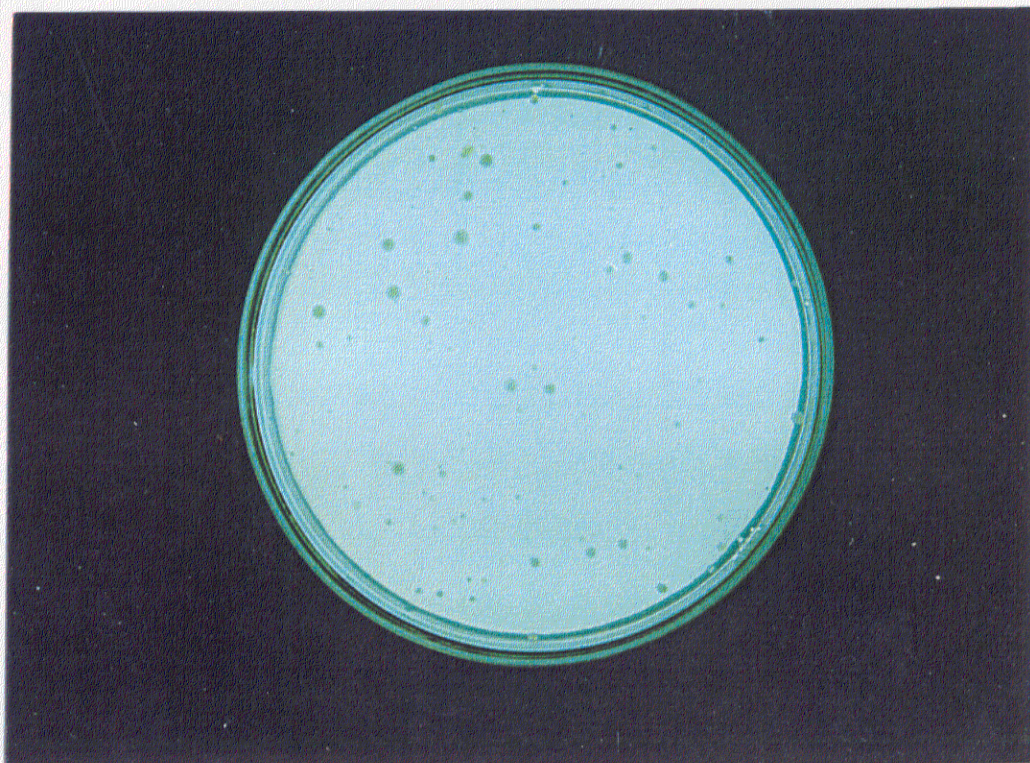
CEPAS BACTERIANAS	Nº DE REVERTANTES ESPONTANEOS/Placa
TA 1535	5.....50*
TA 100	60.....220*
TA 98	15.....75*
Ta 1538	5.....40*

Es obvio que una desviación fuera de la amplitud de variación aceptada indicará la pérdida de al menos alguna característica genética de la cepa cuestionada. Una tasa de mutación muy elevada podría deberse a una contaminación, motivo por el que la cepa debe reaislarse del cultivo permanente almacenado.

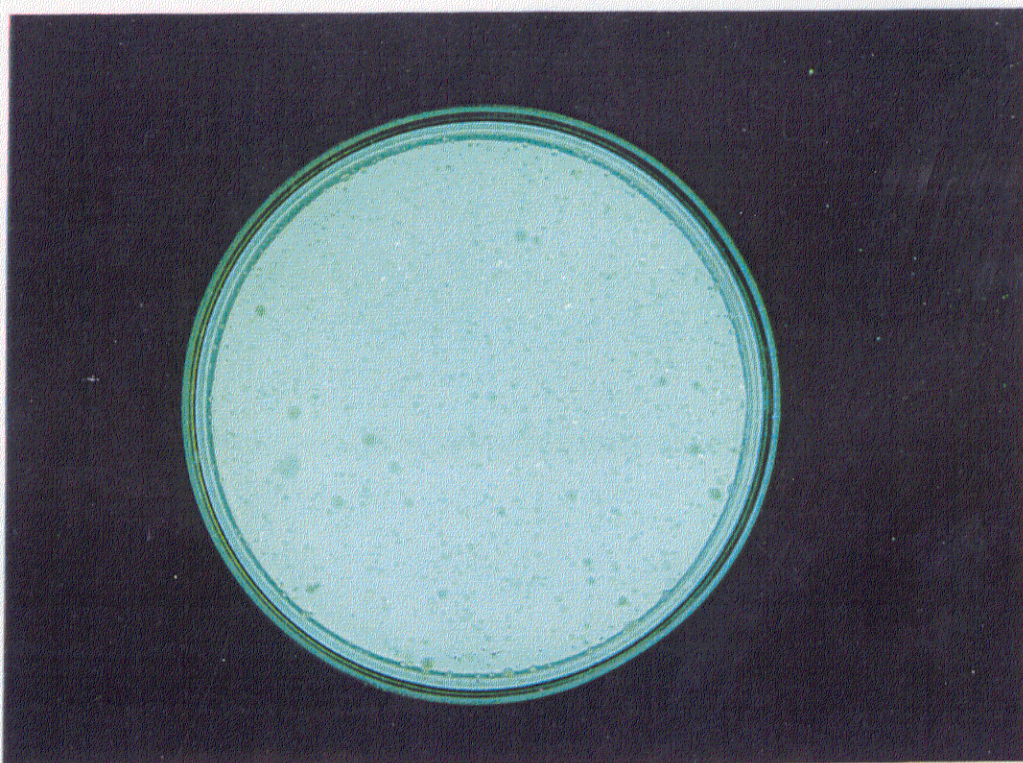
Para detectar el número de revertantes espontáneos por cepa y placa, se añade 0,1 ml de cultivo bacteriano iniciando la fase estacionaria de crecimiento, a 2 ml de agar blando, se mezclan y se vierten en la superficie de una placa de agar glucosado. Si el ensayo se realiza con activación metabólica, se añaden al tubo de agar blando 0,5 ml de mezcla S-9 (Materiales, pág. 80). Se deja solidificar y se incuban en estufa a 37° C durante 48h. Finalizado el período de incubación, se cuentan las colonias revertidas en cada placa. Si no se encuentran dentro del intervalo adecuado, es decir, si están fuera del rango de reversión espontánea correspondiente a la cepa, han de eliminarse los "stocks" bacterianos.

El número de revertantes que se alcanza espontáneamente durante las 48 horas de incubación depende del número de bacterias autotróficas que forman el lecho bacteriano, lo cual si está influenciado por la concentración de histidina. Ames y col. 1983 ponen énfasis al indicar que el número de revertantes espontáneos por placa es completamente independientes del número de bacterias plaqueadas al inicio del ensayo, estando siempre dentro de amplias márgenes de células plaqueadas (10^5 - 10^8).

El número de revertantes inducidos por placa depende del número de bacterias plaqueadas ya que, al ser sucesos mutacionales raros (en número muy escaso), es esencial utilizar grandes poblaciones de bacterias en los ensayos de mutagenicidad. La máxima sensibilidad se consigue plaqueando 2×10^8 bacterias.



Fotografía 3. *Mutación espontánea, Salmonella typhimurium cepa TA98.*



Fotografía 4. *Control positivo, Salmonella typhimurium cepa TA98 (mutágeno estándar)*

2.3.4.7. *Respuesta al mutágeno estandar*

Se utilizan mutágenos conocidos para confirmar las propiedades de la reversión y la especificidad de cada cepa así como para comprobar la eficacia de la mezcla de S9 (controles positivos). En la Tabla 4 y 5, aparecen los mutágenos estandar utilizados en nuestro ensayo como control para cada cepa, así como las dosis de cada uno utilizadas, expresadas en $\mu\text{g/placa}$, y el número de revertantes inducidos (Fotografía 4).

Tabla 4 y 5, Respuestas a mutágenos estandar.

a): Ensayo sin activación metabólica: (Tabla 4)

CEPAS	MUTAGENO ESTANDAR	DOSIS	NºREVERTANTES
TA 1535	Azida sódica **	1,5 $\mu\text{g/pp}$	700-1000
TA 100	Azida sódica **	1,5 $\mu\text{g/pp}$	3.000
TA 98	2-4 Nitrofluoreno *	0,2 $\mu\text{g/pp}$	300-500
TA 1538	2-4 Nitrofluoreno *	0,2 $\mu\text{g/pp}$	1.500

* Ames y col. (1975)

** Maron y Ames (1983)

b) Ensayo con activación metabólica, se comprueba la actividad de la mezcla S9 en la cepas TA 98 Y TA 100. (Tabla 5)

CEPAS	MUTAGENO ESTANDAR	DOSIS	N° REVERTANTES
TA 98	2-Aminofluoreno**	10 μ g/pp	6.194
TA 100	2-Aminofluoreno**	10 μ g/pp	3.026

Para la realización de este ensayo se procede igual al ensayo de mutación espontánea, añadiendo 0,1 ml del control positivo a utilizar en el tubo de agar blando (Figura 22).

2.4. Ensayo de mutagenicidad con *Salmonella typhimurium*

El método operativo utilizado es el ensayo de incorporación en placa con *Salmonella typhimurium* descrito por Ames y col. (1975). En síntesis consiste en mezclar las distintas cepas bacterianas y la sustancia problema en un top agar ó agar blando, y verterlo en una placa de agar glucosado (Figura 22). El método se realiza con dos variantes:

1. sin activación metabólica (-S9), es decir sin agregar al medio de cultivo el activador de función hepática S9 (pág. 105)
2. en presencia de activación metabólica (+S9) (pág. 105)

2.4.1. Ensayo de incorporación en placa

Para el desarrollo del ensayo, se distribuye en tubos, alícuotas de 2 ml de una disolución (10:1) de agar blando (Materiales, pág. 80) a 45° C y disolución estéril de histidina-biotina, agitándolos y manteniéndolos a 45°C hasta su utilización (se preparan 3 tubos por muestra, los controles positivos y negativos y la mutación

espontánea).

En el ensayo sin activación metabólica, a los tubos descritos anteriormente se añaden, en este orden 0,1 ml de la disolución de la muestra problema (apartado 2.1.2. pág. 89) y 0,1 ml del cultivo bacteriano fresco (en fase estacionaria inicial) (apartado 2.3.1.,pág. 94) como se indica en la Tabla 6 (pág.108).

Para los ensayos con activación metabólica, se añade además 0,5 ml de la mezcla de activación enzimática S9 (apartado 2.2., pág. 92) Tabla 7 (pág. 108). Se agitan los tubos y la mezcla se extiende sobre la superficie de una placa de agar glucosado. Se deja solidificar el agar, se incuban las placas a 37°C durante 48-72 horas, y se realiza el recuento colonias revertantes en cada placa. Todas las experiencias se realizan por triplicado, llevando los controles pertinentes, tanto positivos (que indican la respuesta de la cepa frente a un mutágeno conocido, apart. 2.3.4.7., pág. 103) como negativos (que deben de tener una tasa de mutación igual a la de la mutación espontánea, apart. 2.3.4.6., pág. 100). Los resultados se expresan como número de revertantes por placa rev/pp.

La mayoría de los productos químicos mutagénicos son tóxicos para cualquier bacteria a una determinada concentración. Cuando esto ocurre, se produce disminución del número de revertantes en las placas (muerte celular). La observación rutinaria del lecho bacteriano consecuencia de las trazas de histidina y biotina que se añadieron al agar blando (apart. 2.3.4.6., pág.100) es determinante para verificar la toxicidad del producto químico ensayado e interpretar los resultados. Si ocurre una muerte masiva, el lecho bacteriano de las placas estará poco denso en relación con las placas control, debido a que hay mas histidina disponible en el medio para las bacterias supervivientes, las cuales sufriran mas divisiones celulares y aparecerán como pequeñas colonias (Maron y Ames 1983).

2.4.2. Controles de esterilidad de los ensayos con *Salmonella typhimurium*

En cada ensayo deben además realizarse los siguientes controles encaminados a garantizar y comprobar la esterilidad de los medios utilizados:

- i) Dos tubos de agar blando con 0,5 ml de fracción microsomal se decantan en sendas placas de agar glucosado y se incuban en estufa durante 48-72 horas, a 37°C.
- ii) Dos tubos de agar blando, se mezclan con el DMSO que se ha utilizado para disolver las muestras y se decantan en placas de agar glucosado. Se incuban en estufa a 37°C durante 48-72 horas.
- iii) Dos tubos que contienen agar blando del mismo matraz que los empleados en la siembra se introducen en el mismo baño a 45°C y se extienden al final de la siembra en placas de agar glucosado; se incuban junto con las placas inoculadas hasta el momento de la lectura.
- iv) Dos placas de agar glucosado de la misma fecha de realización que las empleadas para la siembra, son asimismo incubadas en estufa a 37°C durante las 48-72 horas.

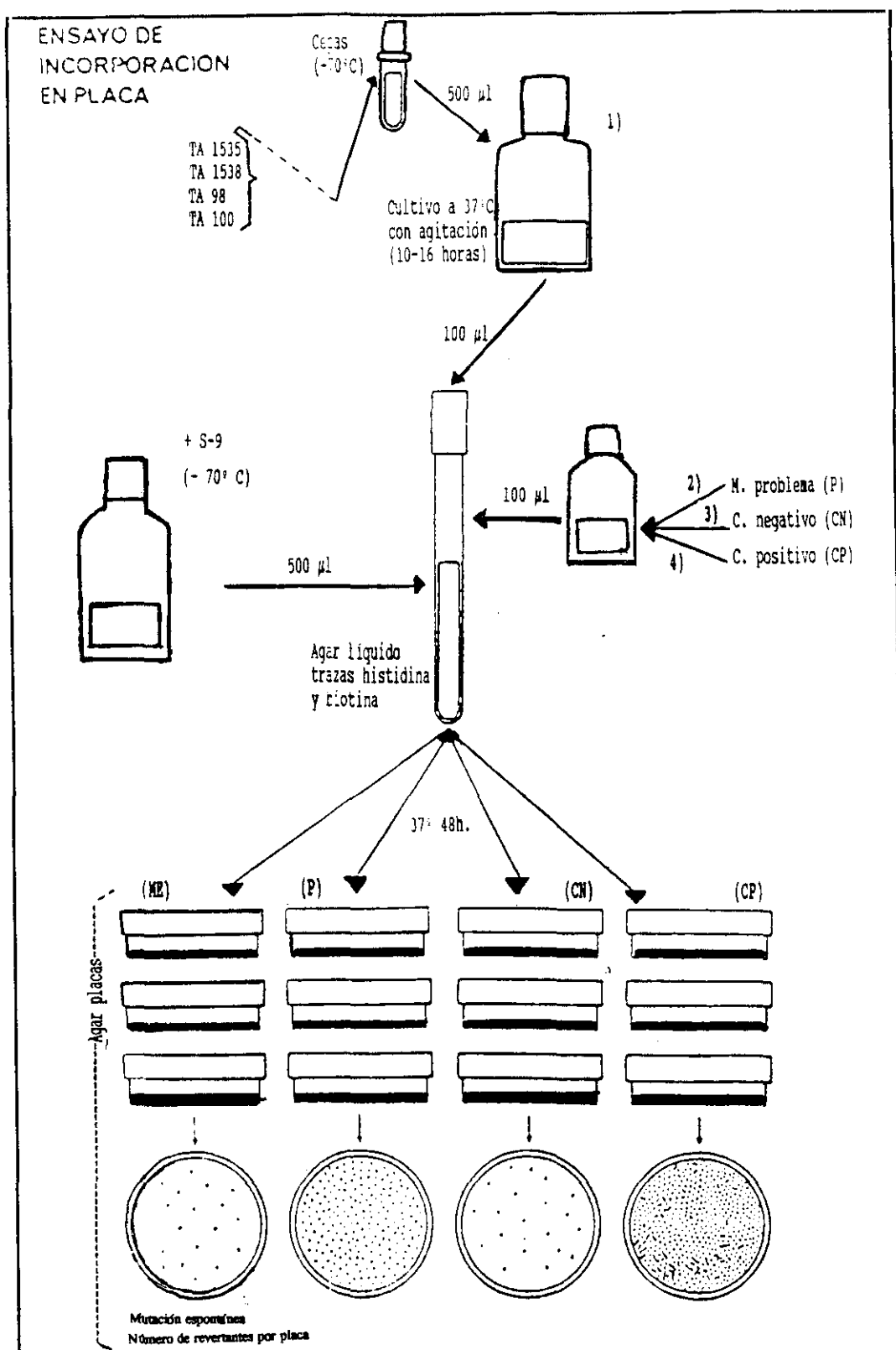


Figura 22. Ensayo de incorporación en placa. Test de Ames.

Tabla 6, Ensayo de incorporación en placa, sin activación metabólica

	CONTROL REV. ESPONTANEA	CONTROL (-)	CONTROL (+)	MUESTRA
DISOL. BACT.(ml)	0,1	0,1	0,1	0,1
DMSO (ml)		0,1		
MUTAGENO ESTANDAR (ml)			0,1	
ENSAYO				0,1

Tabla 7. Ensayo de incorporación en placa, con activación metabólica

	CONTROL REV ESPONTANEA	CONTROL (-)	CONTROL (+)	MUESTRA
DISOL. BACT.(ml)	0,1	0,1	0,1	0,1
DMSO (ml)		0,1		
MUTAGENO ESTANDAR (ml)			0,1	
ENSAYO				0,1
+S9 MIX	0,5	0,5	0,5	0,5

2.5. CUANTIFICACION DEL EFECTO MUTAGENICO

2.5.1. Método basado en el cálculo del índice de mutación

Se denomina índice de mutación al cociente resultante de dividir el número de colonias revertantes inducidas por el número de colonias revertantes espontáneas. El índice de mutación es un término equivalente al incremento relativo de revertantes (Mattern, 1981).

El número de revertantes por placa corresponde en realidad, a la media del número de revertantes obtenido en las tres placas de cada muestra, pues como ya se ha dicho, todas las experimentos se realizan por triplicado. En nuestro caso para evaluar el índice de mutación hemos seguido el método indicado por Ames y col. (1975b). Atendiendo al índice de mutación, los valores por debajo de 2 generalmente indican sustancias no mutagénicas, valores comprendidos entre 2 y 3 sugieren la presencia de sustancias mutagénicas y superiores a 3 indican la presencia de actividad mutagénica (Commoner y col. 1978).

El índice mutagénico (IM) se refleja en la cualidad, de ésta forma: las distintas anotaciones correspondientes a la cualidad tienen el siguiente significado:

- NM = No mutagénico (IM inferior a 2)
- SM = Sustancias mutagénicas (IM entre 2 y 3)
- AP = Actividad mutagénica (IM mayor de 3)
- T = Efecto tóxico (ausencia de lecho bacteriano, crecimiento de muchas colonias pequeñas).

En las Tablas básicas los IM igual ó superior a 2 los hemos representado en rojo.

V- RESULTADOS

1. PRESENTACION: Tablas, Diagramas y Variables

El nº de muestras utilizadas en el presente estudio corresponden a las recogidas durante 12 meses consecutivos en 5 puntos de muestreo, y de las que se extraen 3 fracciones diferentes, por tanto: 180 muestras básicas.

Con cada una de las 180 muestras se realizaron 2 ensayos de mutagenicidad utilizando 4 cepas bacterianas, y en dos condiciones distintas: sin digerir (-S9) e digeridas con la fracción microsomal de extracto hepático de rata (+S9). En aquellos casos en que los resultados de ambos ensayos (1º y 2º) no coincidían se realizó un 3º ensayo de mutagenicidad. Por tanto se produjeron un total de: 2.937 análisis. Los índices de mutagenicidad (IM, pág. 109) presentados en cada análisis corresponden a la media de 3 datos numéricos, ya que los análisis se realizaron por triplicado.

Por tanto se manejarón en total las siguientes variables:

- 5 puntos de muestreo: P1, P2, P3, P4, P5.
- 12 meses: Jn, Jl, Ag, S, O, N, D, E, F, Mz, Ab, My.
- 3 fracciones: 1ª Fr, 2ª Fr, 3ª Fr.
- 4 cepas bacterianas: TA1535, TA1538, TA98, TA100.
- 3 ensayos de mutagenicidad: ensayo 1, ensayo 2, ensayo 3.
- 2 condiciones metabólicas: -S9 y +S9.

Para facilitar la comprensión de los datos a fin de poder extraer de ellos la máxima información, se presentan los resultados de diferentes formas:

- Tablas básicas de índices de mutagenicidad.
- Diagramas de barras.

- **Tablas básicas:** 1 por punto de muestreo, con datos de los ensayos 1 y 2.

Tablas: 1, 2, 3, 4, 5; y Tablas 6 y 7, en las cuales se recogen todos los resultados obtenidos en el ensayo 3 (Apéndice).

- **Diagramas de barras:** Corresponden únicamente al ensayo 1. Ya que los resultados del ensayo 2 son menos relevantes, en general confirman los datos negativos del ensayo 1 y muestran la pérdida del carácter tóxico ó genotóxico de las muestras puesto de manifiesto en el ensayo 1. Esto indica poca estabilidad de las mismas. Existen tres tipos de diagramas:

Por punto de muestreo. Con los resultados obtenidos con las tres fracciones de las muestras recogidas cada mes, -/+ S9 y para cada cepa bacteriana. Figs.: 23, 24, 25, 26, 27. Permiten obtener en cada punto información respecto del carácter polar y la naturaleza química del genotóxico detectado, partiendo de la comparación de los datos obtenidos en las tres fracciones -/+ S9, y con las distintas cepas bacterianas.

Por fracciones: puntos. Relacionan en cada punto de muestreo los datos obtenidos con las distintas cepas en las muestras de cada mes, -/+ S9. Las Figs. 28, 29, 30, corresponden a los datos de la 1ª fr, 2ª fr y 3ª fr respectivamente. En la Fig. 31 aparecen los correspondientes a las tres fracciones de las muestras recogidas en el punto 5. Permiten estudiar el carácter genotóxico de las aguas de cada punto. Con estos diagramas se puede captar mejor la información que brindan en cada punto de muestreo, los ensayos realizados con las 4 cepas bacterianas. Al comparar que cepas resultan mas sensibles a las muestras recogidas en cada punto, se puede indicar el tipo de mutágeno/s mas probable en ellas.

Por fracciones: cepas bacterianas. Relacionan los datos obtenidos con cada cepa bacteriana, en las muestras de todos los puntos de muestreo en cada mes -/+ S9. Figs. 32, 33, 34. Permiten extraer mejor las conclusiones globales con respecto al carácter genotóxico que detecta cada una de las cepas (según la sensibilidad de sus mutaciones), en cada mes y a lo largo del río muestreado; luego indicarian qué zonas del río tienen mayor carácter genotóxico en sus aguas, atendiendo a la cepa considerada, y en definitiva que fracción y cepa bacteriana sería la mas adecuada para estudiar la genotoxicidad de las aguas del río en cada punto de muestreo.

En los diagramas de barras se utilizan códigos de colores para facilitar la comparación de los datos., Las equivalencias "color-variable" aparecen en el pie de figura.

Conceptos básicos:

Como ya se indico en la sección de Materiales y Métodos, las fracciones 1^a, 2^a y 3^a corresponden a eluidos con distintas mezclas agua/acetonitrilo, de los compuestos retenidos en columnas cromatográficas Waters-Millipore C¹⁸ (pág. 91). Estas columnas retienen la materia orgánica en función de la polaridad, al filtrar por ellas 12 litros de cada muestra de agua recolectada.

- fracción 1^a - con agua/acetonitrilo (4:1), se eluyen compuestos orgánicos solubles o ligeramente miscibles en disolventes polares (cetonas, alcoles, fenoles, quinonas, etc.).
- fracción 2^a - con agua/acetonitrilo (1:4), se eluyen compuestos orgánicos solubles en disolventes moderadamente polares (grasas, colorantes, fenoles, alquitranes, etc. ICPS, 1993)
- fracción 3^a - resultante de mezclar las dos fracciones anteriores (1^a Fr/2^a Fr, 1:1). La polaridad de las muestra así obtenidas, se sitúan en un valor intermedio entre las de la 1^a y 2^a Fr. Por otra parte, con la 3^a Fr se puede poner de manifiesto si existe ó no sinérgismo, antagonismo ó potenciación etc. entre los posibles genotóxicos contenidos en las muestras de agua y eluidos en las distintas fracciones.

Cada una de las cepas bacterinas utilizadas es sensible a determinados genotóxicos en función de las mutaciones que las caracterizan (Mat. y Mét. pág. 82)

- La TA 1535 y TA 100: sensibles a productos genotóxicos que provocan, sustituciones del par de bases A-T ▶ G-C (agentes alquilantes, metilantes, etc.)
- La TA 1538 y TA 98: sensibles a genotóxicos que provocan desplazamiento en la lectura del DNA por la adicción ó delección de pares de bases (compuestos aromáticos).

Se considera que existía carácter genotóxico en las muestras, cuando en el ensayo con cualquier cepa bacteriana el índice de mutagenicidad (IM) era ≥ 2 (Mat. y Met. pág. 109). El carácter tóxico significa la muerte total o parcial de la cepa bacteriana y se aprecia ésta última por el crecimiento inadecuado de las bacterias que forman el lecho bacteriano, observándose colonias diminutas esparcidas por toda la placa debido a la presencia de trazas de histidina-biotina, (Mat. y Met. pág. 100).

2.

ESTUDIO DE LA GENOTOXICIDAD POR PUNTOS DE MUESTREO: ENSAYO 1, 2 Y 3.

2.1. PUNTO 1

Ensayo 1

La localización y descripción del P1 en la pág. 67 de la Sección "Descripción del área de estudio".

Los resultados de la muestra recolectados en el P1 en ensayos 1 y 2 llevados a cabo con las 4 cepas bacterianas, se exponen en las Tabla básica 1 (Apéndice) y las Figuras 23, 28, 29, 30.

1ª fracción (Fig. 28): Son claramente genotóxicas las muestras de abril (Ab) para las cepas **TA1535** (IM=3,28) y **TA98** (IM=2,81); la de F para **TA98** (altamente genotóxica IM=5,56) y la de J1 (IM=2,36) para la cepa **TA1538**. Además rozan la genotoxicidad (IM **ligeramente** < 2) las muestras de: Ag (1,95), F (1,92) y Ab (1,8), para **TA1538**; las dos primeras dada su proximidad al umbral genotóxico las consideraremos como tales. Se corrobora la presencia de sustancias genotóxicas en la 2ª Fr de las muestras de Ag y Ab.

La **2ª fracción** (Fig. 29). Muestras más ácida y compuestos químicos mas apolares a los de la 1ª Fr. Como en la 1ª Fr aparecen compuestos genotóxicos en F (4,94) para la cepa , y en Ab para tres cepas: TA1535 (IM=2,23), TA1538 (IM=2,27), y TA 98 (IM=1,94). Los IM obtenidos en los meses de F y Ab, excepto el que corresponde a cepa TA 1538, descienden considerablemente en relación a la 1ª Fr. Aparece carácter tóxico en las muestras de los meses de Jn y Ag para la cepa TA1535 y la de Ag para la TA1538. Se observan indicios de genotoxicidad en las muestras de My para la cepa TA 1538 (1,85) y O para la TA 98 (1,85).

Al analizar la **3ª fracción**, desciende el número de muestras genotóxicas en relación a las fracciones anteriores. Solamente se detecta genotoxicidad en las muestras de D para la cepa TA1538 (IM=1,94) y las de Ab (1,98) y My (2,69) para la cepa TA1535. En la muestra de Ab desciende el IM respecto a la 1ª y 2ª Fr, en My por el contrario aumenta éste alcanzándose carácter genotóxico.

+S9

Cuando se tratan las muestras con la fracción microsomal de hígado de rata **+S9**, en general desaparece el carácter genotóxico y tóxico de todas las muestras ensayadas sin S9 (Figs. 28, 29, 30), pero se induce carácter genotóxico para la cepa 1535 en las muestras de las tres fracciones del mes de Jn, siendo la genotoxicidad de la 1ª Fr. (IM = 2,1) la mas débil, la de la 2ª Fr. (3,9) la mas potente, y el valor de la 3ª Fr se situa entre los anteriores (2,48). Por otro lado, tras la digestión se mantiene en la 2ª Fr el carácter tóxico de la muestra de Ag para la cepa TA1535 y se induce en la 3ª Fr ligera genotoxicidad en S (2,13) para la TA1538.

Por tanto, como puede apreciarse solo las fracciones 1ª, 2ª y 3ª de las muestras del mes de abril sin digerir (Ab/-S9), junio digeridas (Jn/+S9) y las fracciones 1ª y 2ª de F coinciden en su carácter genotóxico para determinadas cepas.

Ensayo 2

Los índices mutagénicos obtenidos en el ensayo 2 con las muestras recogidas en el P1 se presentan en la Tabla básica 1. Todos los resultados que en el ensayo 1 indicaban ausencia de carácter genotóxico, se confirman en el ensayo 2, pero en este 2^a ensayo no se detecta el carácter genotóxico o tóxico de las muestras del P1 que eran positivos en el 1^o ensayo.

Ensayo 3

Los resultados se presentan en las Tabla básica 6. Se realizó un 3^o ensayo solo con las muestras cuyos resultados no eran coincidentes en el ensayo 1 y 2. En este caso todos los resultados indican la pérdida del carácter genotóxico de las muestras tras el almacenamiento a -80 °C.

En el cuadro 1, se expone un resumen de todos los resultados descritos correspondientes al P1.

PUNTO 1

ENSAYO 1, 1ª, 2ª Y 3ª FRACCION

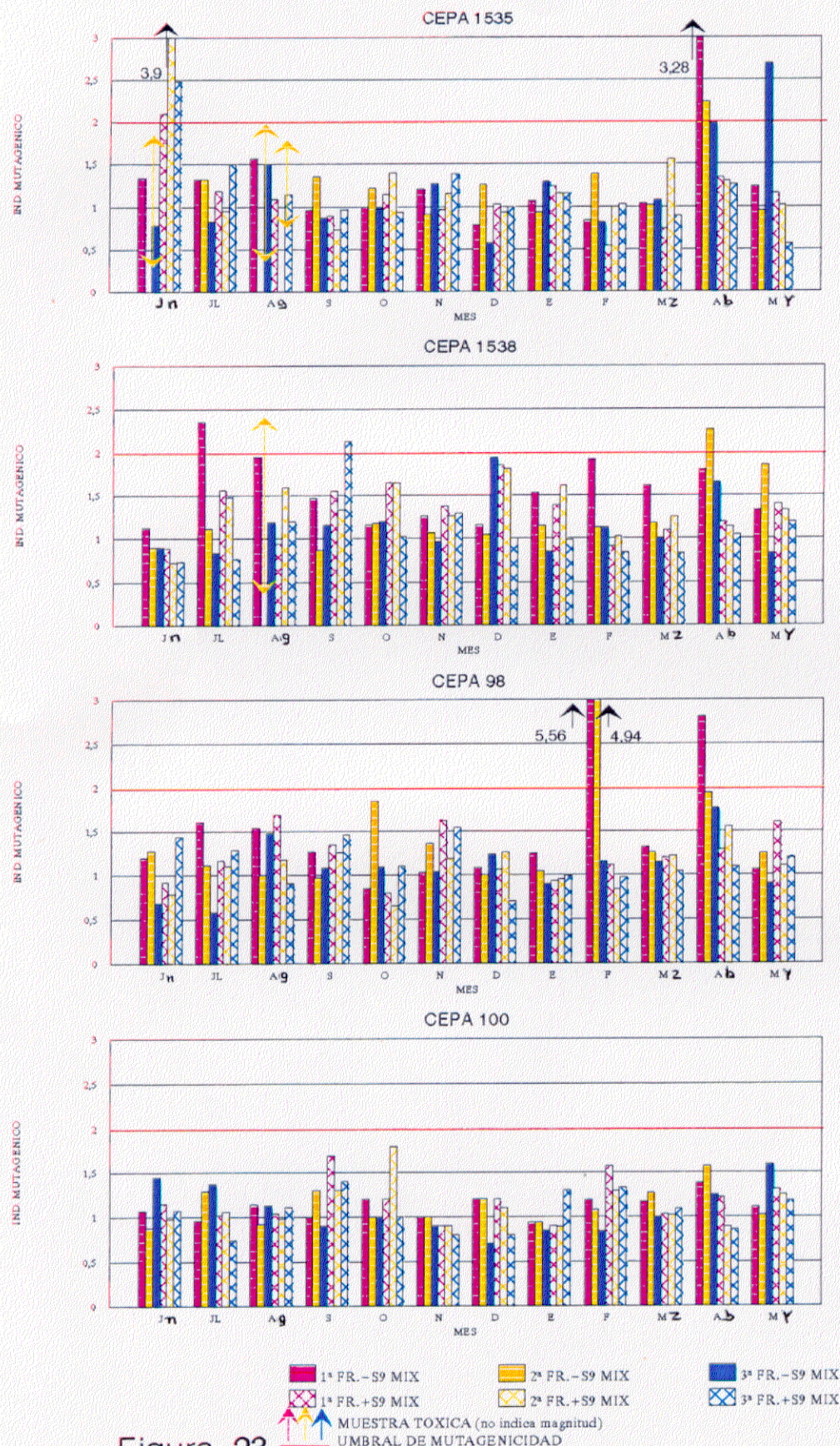


Figura 23.

Cuadro 1: Muestras genotóxicas ó tóxicas correspondientes al punto 1 (Ensayo 1)

		POSIBLES MUTAGENOS		MUTAGENOS POSITIVOS		TOXICIDAD	
		-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9
1ªFRACCION	Nº casos/%	3/6,25		4/8,33	1/2,08		
	Cepa/Mes	TA1538/Ag, F y Ab		TA1535/Ab; TA98/Ab y F; TA1538/Jl;	TA1535/Jn		
2ªFRACCION	Nº casos/%	2/4,16		4/8,33	1/2,08	3/6,25	1/2,08
	Cepa/Mes	TA1538/My; TA98/O		TA1535/Ab; TA1538/Ab; TA98/F y Ab;	TA1535/Jn	TA1535/Jn y Ag; TA1538/Ag;	TA1535/Ag
3ªFRACCION	Nº casos/%	1/2,08		2/4,16	2/4,16		
	Cepa/Mes	TA1538/D		TA1535/Ab y My	TA1535/Jn; TA1538/S		

Nº casos: nº de casos positivos en el ensayo.

%: Porcentaje de casos positivos respecto del total (N=4 cepas x 12 meses= 48)

Mes: Mes de recolección de la muestra

+ S9: Muestras tratadas con la fracción microsomal de extracto de hígado de rata.

2.2. **PUNTO 2**

Ensayo 1

La localización y descripción del P2 aparece en la pág.71. En la Tabla básica 2 (Apéndice) y las Figs. 24, 28, 29 y 30 se exponen los valores obtenidos en los ensayos de genotoxicidad con las distintas cepas utilizadas.

En la **1^o fracción** (Fig. 28) de las muestras del mes de Jl se detectan sustancias genotóxicas para la cepa **TA1535** (1,95; genotóxico débil, el cual confirma su genotoxicidad en la 3^a fr); cepa **TA1538** (3,64; genotóxico fuerte) y cepa **TA98** (2,31). Además se aprecia carácter genotóxico en las muestras de los meses de S (2,22) y My (2,25) ambos para la cepa **TA1538**.

En la **2^a fracción** (Fig. 29) son las cepas **TA1535** y **TA98**, las que detectan sustancias genotóxicas en las muestras de algunos meses del año. Se observa genotoxicidad clara para la cepa **TA1535** en la de F (2,45) y se sitúa muy próxima al umbral de genotoxicidad la de Jn (1,91), y en la de Ag aparece toxicidad. Con la cepa **TA98** se detecta un potente genotóxico en S (4,2), y proximidad al umbral de genotoxicidad en My (1,93) (en esta muestra se obtuvieron $IM \geq 2$ con la 1^a fr para la cepa TA 1538). Ambas cepas bacterianas (TA 1538 y TA 98) detectan mutágenos que provocan mutaciones del tipo "frameshift" (Mat. y Met. pág.84).

3^a fracción (Fig. 30): En esta fracción la cepa bacteriana que ha resultado ser la de mayor capacidad para detectar sustancias genotóxicas, es la cepa **TA1535**: en Jl (2,07) muestras con carácter genotóxico débil, y en Ag (1,93) y O (1,91) muestras con IM próximos al umbral de genotoxicidad. Hay que indicar que la 2^a Fr de la muestra de Ag era tóxica. La otra cepa con la que se detecta sustancias genotóxicas es la **TA 98** en la 2^a Fr de la muestra de Ab (2,52).

+S9

Al digerir las muestras del, P2 con la fracción metabólica **S9**, se observa que se conserva el carácter genotóxico únicamente en la **1^a Fr** de las muestras de los meses de Jl (2,3) y S (2,05) para la cepa **TA1538**, si bien el poder genotóxico ha disminuido

considerablemente, sobre todo en la muestra de J1. En la 2ª Fr de la muestra de Ag para la TA1535 se conserva también el carácter tóxico.

Por otro lado la digestión de las muestras con la fracción S9 parece inducir, en algunas ocasiones, indicios de genotoxicidad, y en otras, evidencia clara de sustancias mutagénicas para la cepa TA98, en las tres fracciones de la muestra: 1ªFr/+S9: S (1,96), O (1,87) y D (1,96); 2ªFr/+S9: D (1,98); 3ªFr/+S9: O (2,03).

Ensayo 2

Tabla básica 2. Como en el P1, el los resultados obtenidos en el ensayo 2 confirma el carácter no genotóxico de todas las muestra que se manifestaron como tales en el 1º ensayo, y tan solo una muestra, 1ª Fr/S/- S9 para la cepa TA98 (IM = 2,51) que no era genotóxica según el 1º ensayo, adquirió carácter genotóxico tras su almacenamiento hasta la realización del 2º ensayo. Por otra parte de todas las muestras que resultaron genotóxicas para algunas de las cepas utilizadas, solo las de los meses de J1 y My 1ªFr/-S9 (2,1) y (2,11) respectivamente y S 2ªFr/+S9 (2), mantuvieron su genotoxicidad aunque con IM mas bajos a los del ensayo 1. También hay que indicar algunas muestras, las cuales en el ensayo 1 manifiestan carácter positivo, sin embargo en el ensayo 2 los valores son elevados pero no superan el umbral indicativo de mutagenicidad (≥ 2), lo que indica de nuevo pérdida parcial del carácter genotóxico: la 1ª Fr de las muestras S/-S9/TA1538 (1,88) y J1/+S9/TA1538 (1,72); y S/+S9/TA 98 (1,91); la 2ª Fr/-S9 de las muestras: Jn/TA1535 (1,74) y My/TA98 (1,85); y la de la 3ª Fr/-S9, J1/TA1535 (1,98) y Ag/TA1535 (1,68) y Ab/TA 98 (1,86). Con las muestras restantes se obtuvieron valores negativos, lo que indica pérdida del carácter durante el almacenamiento.

Ensayo 3 (Tabla básica 6). Con las muestras que dieron resultados no coincidentes en el ensayo 1 y 2 se realizó un 3º ensayo, obteniendo únicamente en la muestra de Ab, 3ª fr, -S9, cepa TA 98 ligero carácter genotóxico (1,73), habiendo disminuido progresivamente el valor del ensayo 1 al 3.

Cuadro 2: resumen de los resultados correspondientes a P2.

PUNTO 2

ENSAYO 1, 1ª, 2ª Y 3ª FRACCION

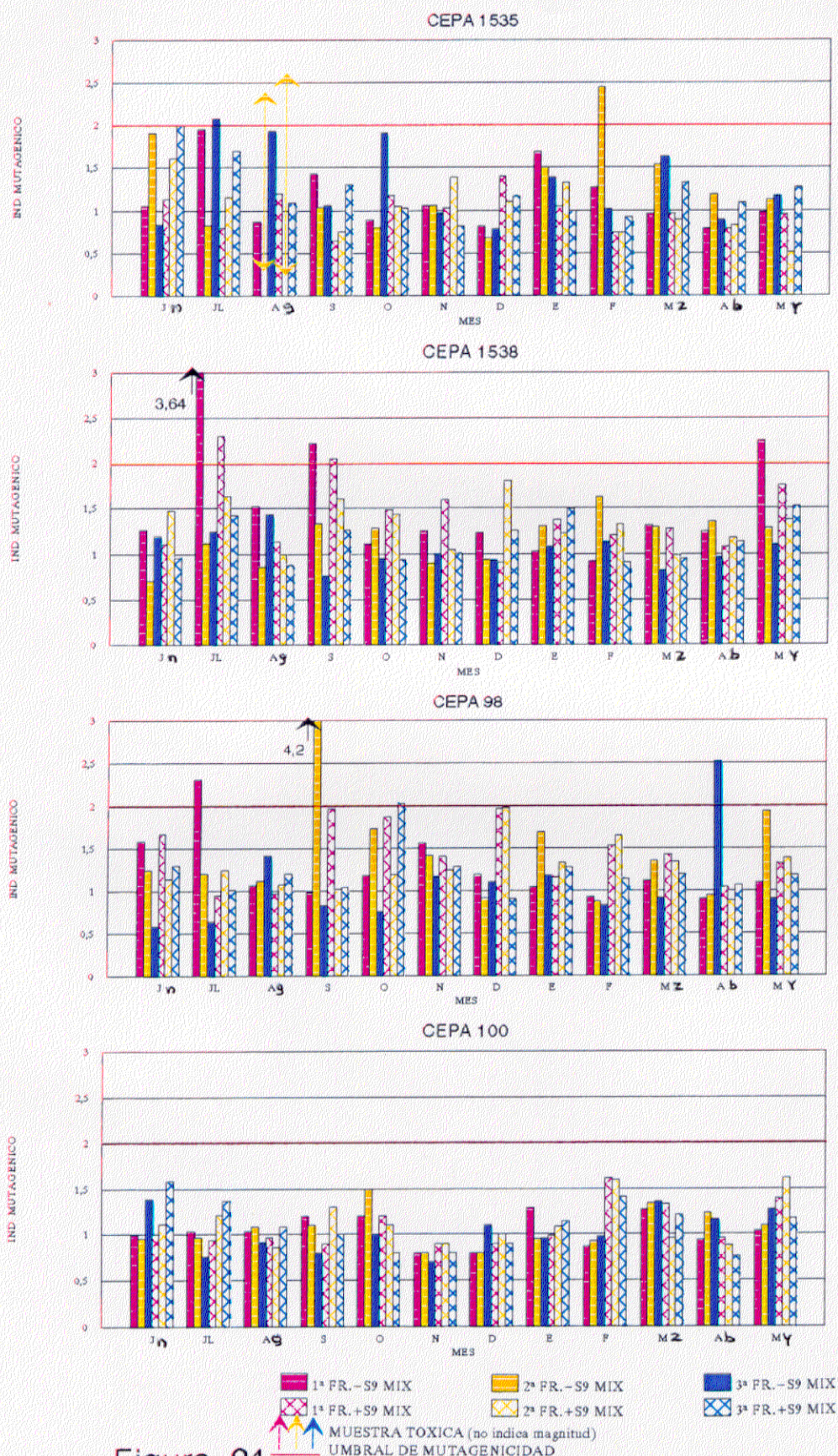


Figura 24.

Cuadro 2: Muestras genotóxicas ó tóxicas correspondientes al punto 2 (Ensayo 1)

		POSIBLES MUTAGENOS		MUTAGENOS POSITIVOS		TOXICIDAD	
		-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9
1ªFRACCION	N° casos/%		1/2,08	5/10,41	4/8,33		
	Cepa/Mes		TA98/O	TA1535/JI;TA1538/JI, S y My; TA98/JI	TA1538/JI y S; TA98/S y D		
2ªFRACCION	N° casos/%			4/8,33	1/2,08	1/2,08	1/2,08
	Cepa/Mes			TA1535/y Jn y F; TA98/S y My	TA98/D	TA1535/Ag	TA1535/Ag
3ªFRACCION	N° casos/%			4/8,33	2/4,16		
	Cepa/Mes			TA1535/JI y Ag y O; TA98/Ab	TA1535/Jn; TA98/O		

N° casos: n° de casos positivos en el ensayo.

%: Porcentaje de casos positivos respecto del total (N=4 cepas x 12 meses= 48)

Mes: Mes de recolección de la muestra

+ S9: Muestras tratadas con la fracción microsomal de extracto de hígado de rata.

2.3. PUNTO 3

Ensayo 1

Localización y descripción del punto 3 en la página 72. Los resultados del ensayo 1 y 2 se muestran en la Tabla básica 3 (Apéndice) y las Figuras: 28, 29, 30.

En general, en este punto al realizar los ensayos -/+ S9 se detectan menos muestras con carácter genotóxico que en los anteriores, y las de carácter genotóxico corresponden a la 1ª y 2ª Fr.

1ª fracción: Fig. 28. Con las muestras sin digerir (-S9) y con la cepa TA1538 se perciben con carácter genotóxico las muestras de: J1 (2,76) y O (1,92), y aparecen inicios de genotoxicidad para la misma cepa TA 538 en las muestras de E (1,63) y F (1,76), y para la cepa TA98 en la de J1 (1,81).

En la **2ª fracción** de las muestras (Fig. 29) se detectan dos casos con carácter genotóxico, Ab/TA100 (2,01) y In/TA1535 (2,19); y uno solo con carácter tóxico para dos cepas bacterianas Ag/TA1535 y Ag/TA1538.

+S9

Al realizar los ensayos en presencia de la fracción microsomal de hígado de rata +S9, en todas las muestras desaparece el carácter genotóxico obtenido al realizar los ensayos sin tratamiento con S9, sin embargo, se mantiene la toxicidad de la 2ª Fr de la muestra Ag/TA1535 y se induce genotoxicidad en la 1ª Fr de la muestra S/TA1538 (2,0).

Ensayo 2

Tabla básica 3. Los resultados del ensayo 2 corroboran el carácter no genotóxico de todas las muestras negativas y el carácter positivo de algunas de ellas sin tratamiesto con S9, detectados en el ensayo 1: 1ªFr/J1/TA1538 (IM=2,11), 2ªFr/Ab/TA100 (2,0), y 2ªFr/TA1535/ (tóxico).

La toxicidad de la muestra de 2ªFr/Ag/TA1538/-S9) no se corrobora, sin embargo los valores de IM obtenidos en el ensayo 2 y 3 (Tablas básicas 3 y 7) son muy bajos (0,47 y 0,49 respectivamente) lo que indica que el tóxico podría estar empezando a eliminarse, iniciandose por tanto leve crecimiento bacteriano. El carácter

positivo (genotóxico o toxico) del resto de las muestras según los resultados positivos del ensayo 1, no se corraoran con el ensayo 2, por lo que dada la discrepancia, se someten a un Ensayo 3 (Tabla básica 7), obteniendose en todas los casos resultados negativos.

En la página 126 se encuentra el cuadro resumen del P3 en el que se indican las muestra con carácter mutagénico del ensayo 1.

PUNTO 3

ENSAYO 1, 1ª, 2ª Y 3ª FRACCION

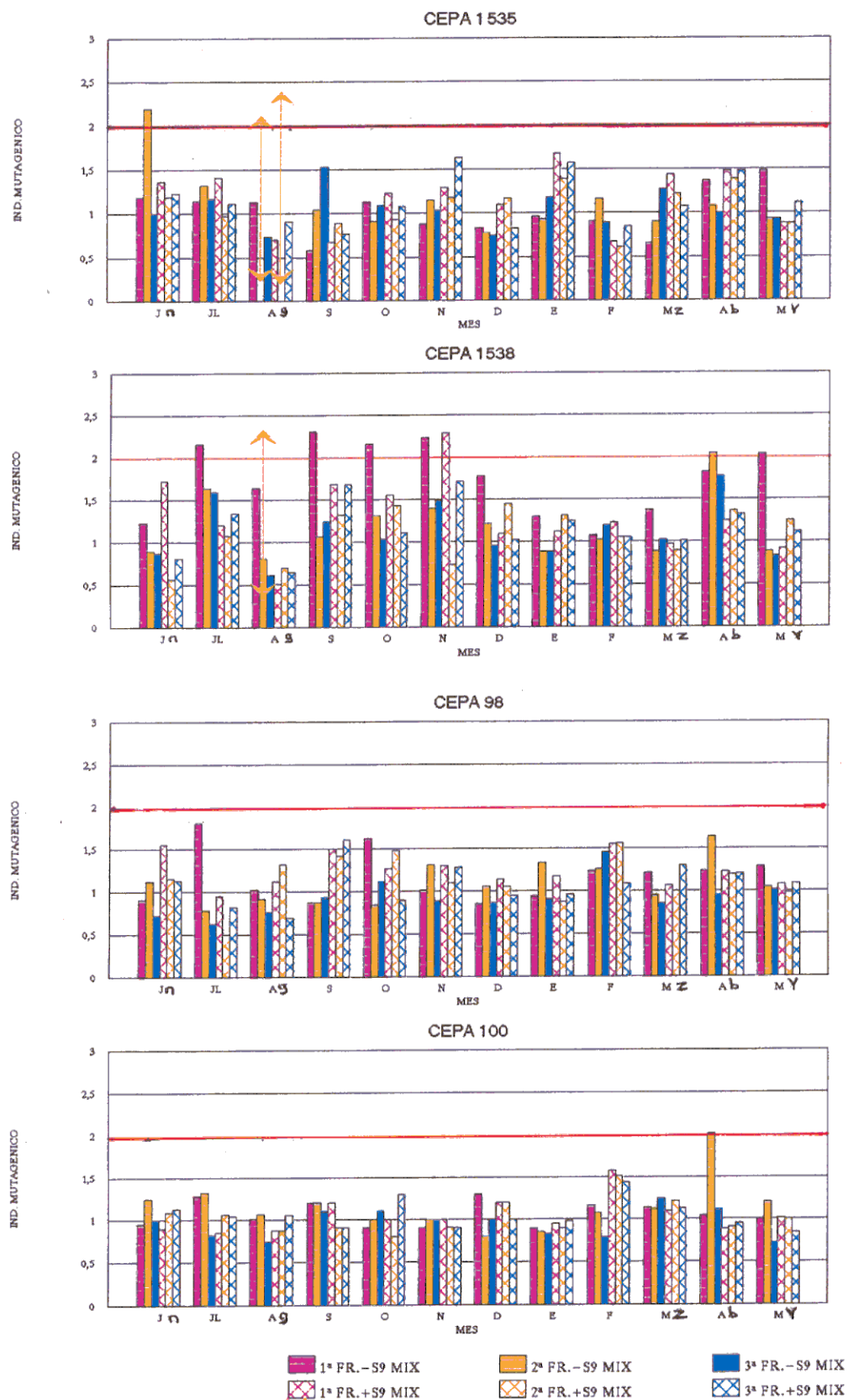


Figura 25.

Cuadro 3: Muestras genotóxicas ó tóxicas correspondientes al punto 3 (Ensayo 1)

		POSIBLES MUTAGENOS		MUTAGENOS POSITIVOS		TOXICIDAD	
		-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9
1ªFRACCION	Nº casos/%	2/4,16		2/4,16	1/2,08		
	Cepa/Mes	TA1538/Mz; TA98/JI		TA1538/JI y O	TA1538/S		
2ªFRACCION	Nº casos/%			2/4,16		2/4,16	1/2,08
	Cepa/Mes			TA1535/Jn; TA100/Ab		TA1535/Ag; TA1538/Ag	TA1535/Ag
3ªFRACCION	Nº casos/%						
	Cepa/Mes						

Nº casos: nº de casos positivos en el ensayo.

%: Porcentaje de casos positivos respecto del total (N=4 cepas x 12 meses= 48)

Mes: Mes de recolección de la muestra

+ S9: Muestras tratadas con la fracción microsomal de extracto de hígado de rata.

2.4. PUNTO 4

Ensayo 1

La Descripción y localización del P4 aparece en la pág.73 y los resultados de las muestras recolectadas en él se exponen en las Tablas básicas 4 y 7, y las Figs. 26, 28, 29, 30.

1ª fracción: Como en los puntos anteriores, la cepa TA1538 resulta ser la mas sensible a la 1ª Fr de las muestras (Fig. 28), detectándose en las de varios meses sustancias mutagénicas: JI (2,16), S (2,31), O (2,16), N (2,23) y My (2,03). Además, con la misma cepa se observan indicios de genotoxicidad (sin alcanzar el umbral necesario, ≥ 2 en las muestras de Ag (1,64), D (1,78) y Ab (1,82). Para la cepa TA1535, se detecta toxicidad únicamente en la muestra de Ag y para la cepa TA98 se obtienen IM próximos al umbral de genotoxicidad: JI (1,8), O (1,87), e indicios de ella N (1,6) y D (1,58). Como se puede observar, las 1ª fracciones de las muestras de JI, O y N son genotóxicas para dos cepas, TA1538 y TA98, las cuales detectan mutágenos del tipo "frameshift".

2ª fracción: (Figura 29). Son menos numerosas las muestras con carácter genotóxico en la 2ª Fr. Solo la muestra de Ab (2,04) es genotóxica para la cepa TA1538, a diferencia de lo que ocurría con la 1ª Fr. Con cepa TA1535 se detecta toxicidad en la muestra de Jn igual que con la 1ª Fr y carácter genotóxico en la de E (2,04). Aparece genotoxicidad incipiente en la muestra de My/TA98 el IM=1,94 se aproxima al umbral de genotoxicidad.

3ª fracción: (Figura 30). Con la cepa TA1535 se detectan sustancias genotóxicas en las muestras de S (2,36) y E (2,43), la 2ª Fr de la muestra de E también era genotóxica. Se observan indicios de genotoxicidad para la cepa TA1538 en la muestra de Ab (1,78; cuyas 1ª y 2ª Fr también eran genotóxicas), y para la cepa TA98 en la de Ag (1,76).

+S9

Al provocar la digestión de la 1ª, 2ª y 3ª Fr de las muestras con el extracto S9, todas las que manifestaban carácter genotóxico ó tóxico para cualquiera de las cepas utilizadas, lo pierden, excepto para la cepa TA1538/1ª Fr/N/ (2,29). Por otro

lado se induce carácter genotóxico para la cepa TA98, en la 1ªFr/N (2,27), 3ªFr/D (2,17), y aparecen indicios de sustancias genotóxicas para la misma cepa en 2ªFr/Jn (1,86).

Ensayo 2

Tabla básica 4. Con este ensayo se corroboran los resultados negativos del Ensayo 1. Por otra parte de todas las muestras que resultaban genotóxicas ó tóxicas para alguna de las cepas utilizadas, solamente mantienen éste carácter: 1ªFr: N/+S9/TA1538 (2,55) y My/-S9/TA 1538 (1,65); 2ªFr: /Ab/-S9/TA1538 (1,98) y My/-S9/TA98 (1,84) y 3ªFr: S/-S9/TA1535 (1,93), pero a excepción de la 1ª en todas se disminuye ligeramente el IM.

El resto de las muestras cuyo carácter genotóxico ó tóxico según el ensayo 1, no se ratifican en el ensayo 2, se sometieron a un **Ensayo 3** (Tabla básica 7), obteniéndose en todos los casos resultados negativos, lo que confirma, la pérdida del carácter deletéreo durante el almacenaje, y la labilidad del compuesto/s genotóxicos contenidos en ella.

En el cuadro 4, se expone un resumen de todos los resultados descritos correspondientes al P4

PUNTO 4

ENSAYO 1, 1ª, 2ª Y 3ª FRACCION

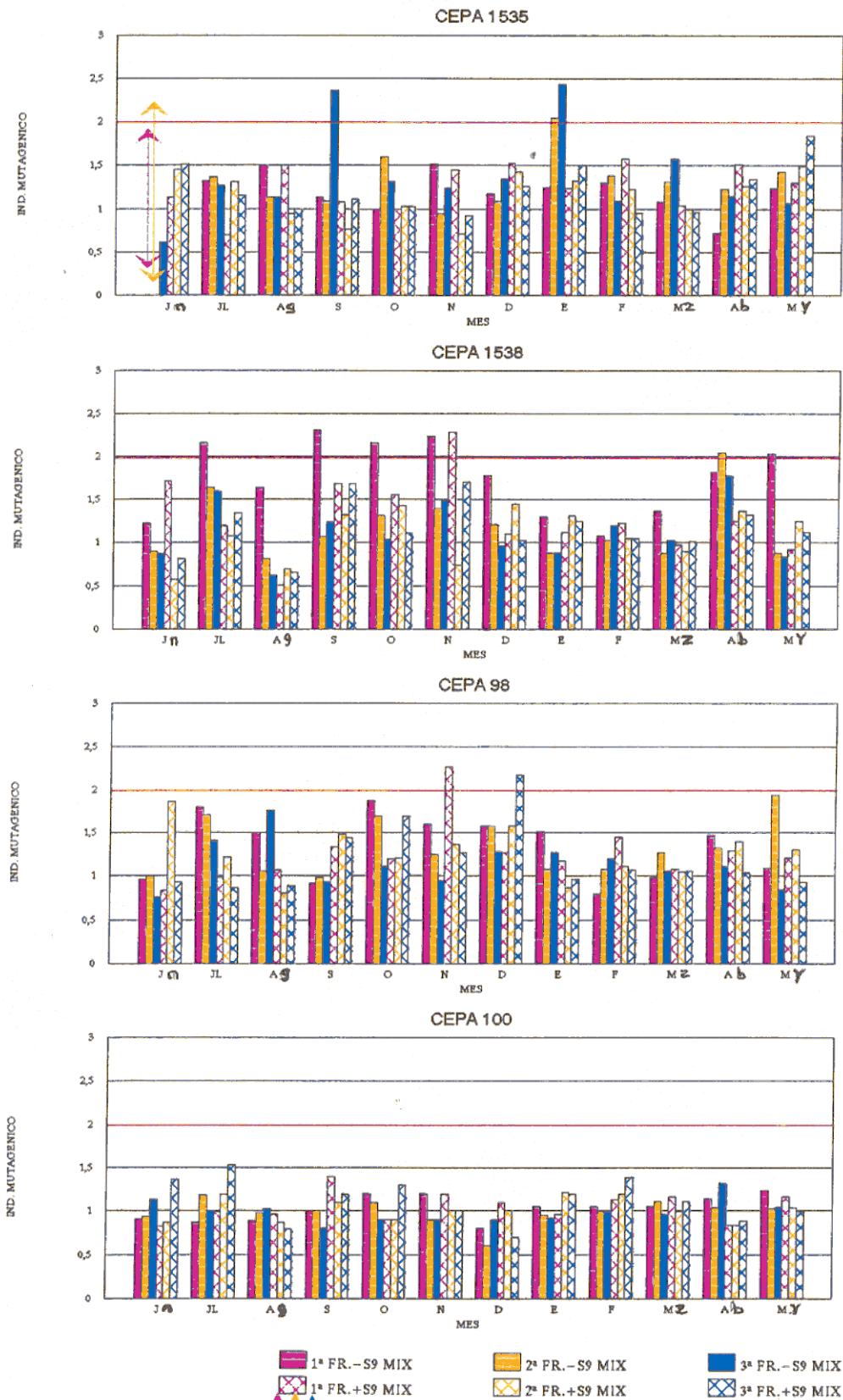


Figura 26.

Cuadro 4: Muestras genotóxicas ó tóxicas correspondientes al punto 4 (Ensayo 1)

		POSIBLES MUTAGENOS		MUTAGENOS POSITIVOS		TOXICIDAD	
		-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9
1ªFRACCION	Nº casos/%	3/6,25		5/10,41	2/4,16	1/2,08	
	Cepa/Mes	TA1538/Ab; TA98/Jl, O		TA1538/Jl, S, O, N, My;	TA1538/N; TA98/N	TA1535/Jn	
2ªFRACCION	Nº casos/%		1/2,08	3/6,25		1/2,08	
	Cepa/Mes		98/Jn	TA1538/A b; TA1535/E; TA98/My		TA1535/Jn	
3ªFRACCION	Nº casos/%			2/4,16	1/2,08		
	Cepa/Mes			TA1535/S y E	TA98/D		

Nº casos: nº de casos positivos en el ensayo.

%: Porcentaje de casos positivos respecto del total (N=4 cepas x 12 meses= 48)

Mes: Mes de recolección de la muestra

+ S9: Muestras tratadas con la fracción microsomal de extracto de hígado de rata.

2.5. PUNTO 5

Ensayo 1

La localización y descripción del P5 aparecen en la página 73. Los resultados en las Tablas básicas 5 y 7, y en la Fig. 21.

1ª fracción: Como puede apreciarse, la muestra de J1 es genotóxica (2,36) para la cepa TA1538, y muestran indicios de genotoxicidad, las muestras de O (1,84), E (1,63), Mz (1,76), A (1,59) y My (1,65) para la misma cepa y la de F (1,96) y Ab (1,76) para la cepa TA98.

2ª fracción: Se aprecia toxicidad en la 2ªFr/Ag/TA1538 y carácter genotóxico la de F/TA98 (2,04) (la 1ªFr/F también era genotóxica para TA98).

3ª fracción: Únicamente se puede considerar con carácter genotóxico la muestra de F/TA1538 (1,98). Con indicios de ligera genotoxicidad hay varias muestras para todas las cepas utilizadas excepto la TA 100: para la cepa TA1535 las de Ag (1,7), E (1,61), Mz (1,81); para la cepa TA1538/My (1,78) y para TA98/J1 (1,69).

+S9

Al realizar los ensayos en presencia de la S9, desaparece de la 1ª, 2ª y 3ª Fr de las muestras el carácter genotóxico ó tóxico que se detectaba con las distintas cepas utilizadas al realizar los ensayos sin S9. Sin embargo, aparece carácter genotóxico en: 1ª Fr de las muestras de: Mz/TA1535 (2,98) y N/TA98 (2,31), D/TA1535 (1,8, indicios de genotoxicidad). En la 2ª Fr: desaparece la toxicidad de Ag/TA 1538, pero aparece toxicidad para la cepa TA1535; el carácter genotóxico de la muestra de F para la cepa TA 98, se disminuye, siendo el IM de la muestra de F/TA98 (1,77), y se induce cierta genotoxicidad en la de Ab/TA1535 (1,83). 3ª Fr La digestión (+S9) de la 3ªFr de todas las muestras hace desaparecer el carácter genotóxico con valores próximos a los correspondientes controles, siendo $\geq 1,5$ únicamente las de S/TA 1538 (1,74) y Ab/TA1538 (1,53) y O/TA 98 (1,66).

Ensayo 2

Tabla básica 5. Los resultados obtenidos en éste ensayo confirman el carácter no genotóxico de todas las muestras que se manifestaron como tales en el 1º ensayo, y tan solo dos muestras con carácter genotóxico en el 1º ensayo se confirmaron en el 2º para la 1ªFr de las muestras: Mz/+S9/TA 1535 (2,41) y JI/-S9/TA1538 (2,1). Con el resto de las muestras se realizó un **3ª Ensayo** (Tabla básica 7), obteniéndose en todos los análisis resultados negativos, lo que indica la inestabilidad de sus genotóxicos.

En el cuadro 5 se muestra un resumen de los resultados del P5 en el Ensayo 1.

PUNTO 5

ENSAYO 1, 1ª, 2ª Y 3ª FRACCION

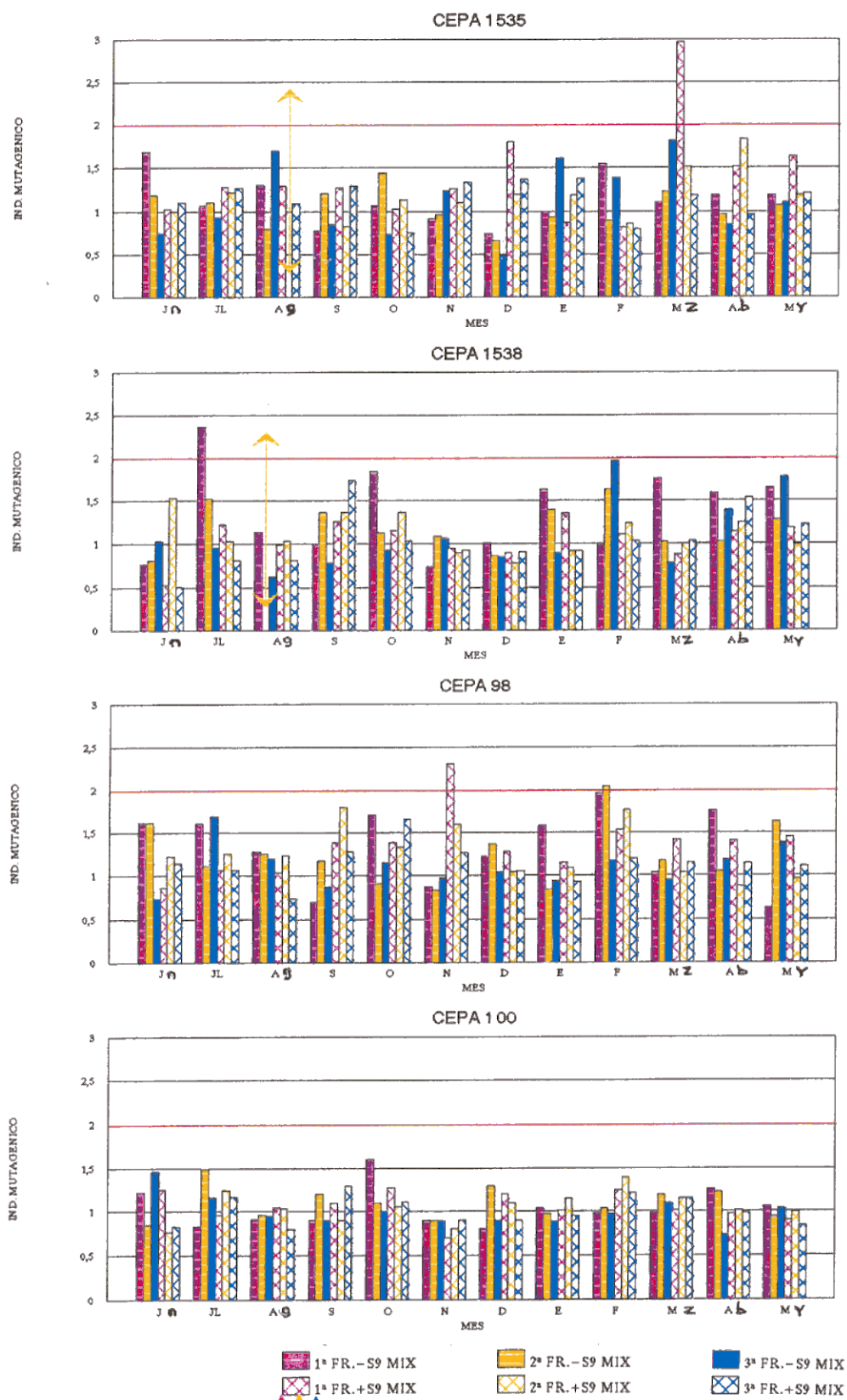


Figura 27.

Cuadro 5: Muestras genotóxicas ó tóxicas correspondientes al punto 5 (Ensayo 1)

		POSIBLES MUTAGENOS		MUTAGENOS POSITIVOS		TOXICIDAD	
		-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9
1ªFRACCION	Nº casos/%	1/2,08	1/2,08	2/4,16	2/4,16		
	Cepa/Mes	TA1538/O	TA1535/D	TA1538/J1; TA98/F	TA1535/Mz; TA98/N		
2ªFRACCION	Nº casos/%		1/2,08	1/2,08		1/2,08	1/2,08
	Cepa/Mes		TA1535/Ab	TA98/F		TA1538/Ag	TA1535/Ag
3ªFRACCION	Nº casos/%	1/2,08		1/2,08			
	Cepa/Mes	TA1535/Mz		TA1538/F			

Nº casos: nº de casos positivos en el ensayo.

%: Porcentaje de casos positivos respecto del total (N=4 cepas x 12 meses= 48)

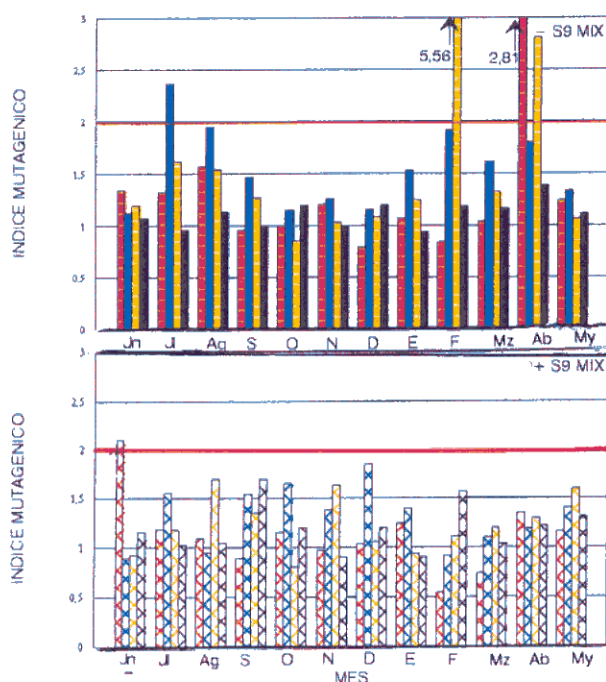
Mes: Mes de recolección de la muestra

+ S9: Muestras tratadas con la fracción microsomal de extracto de hígado de rata.

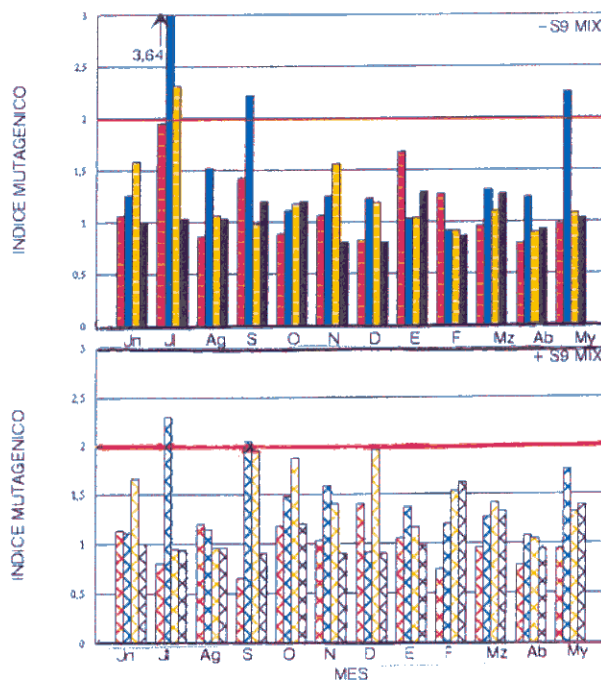
PUNTOS DE MUESTREO

ENSAYO 1, 1ª FRACCION

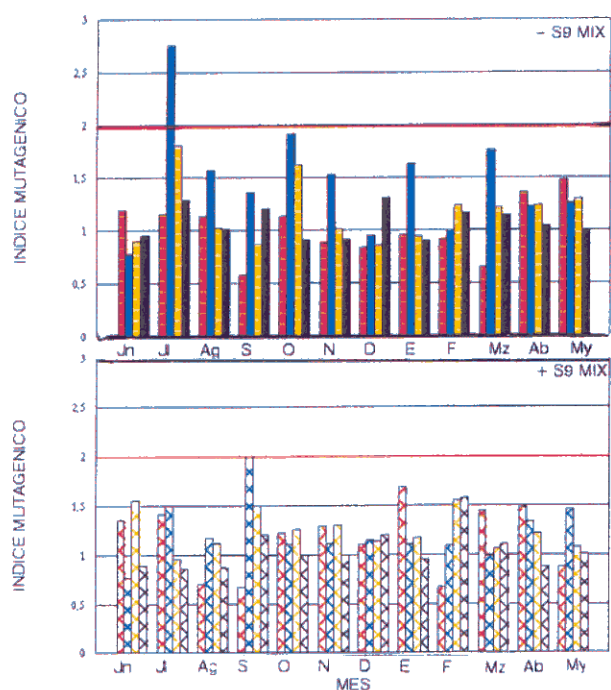
PUNTO 1



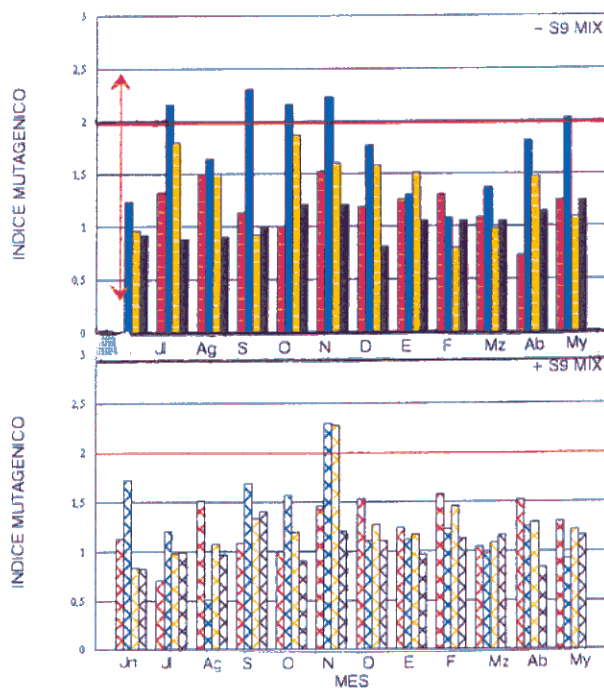
PUNTO 2



PUNTO 3



PUNTO 4



CEPA TA1535

CEPA TA98

CEPA TA1535

CEPA TA98

CEPA TA1538

CEPA TA100

CEPA TA1538

CEPA TA100

Figura 28.

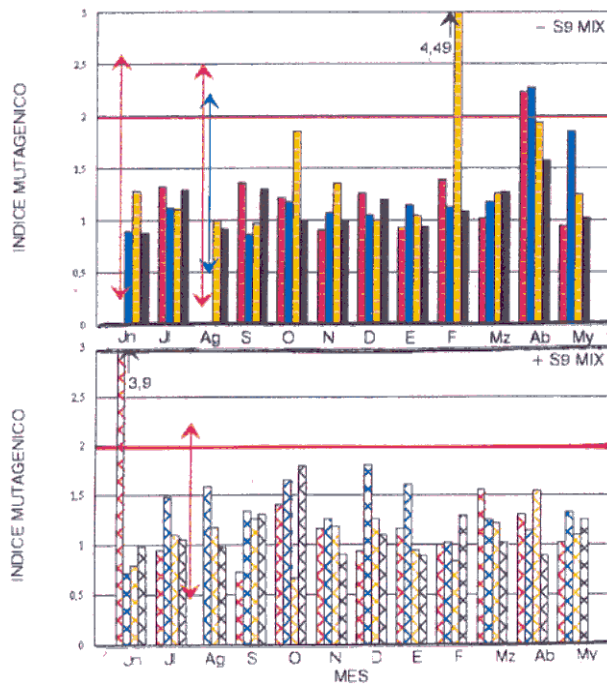


MUESTRA TOXICA (no indica magnitud)
UMbral de MUTAGENICIDAD

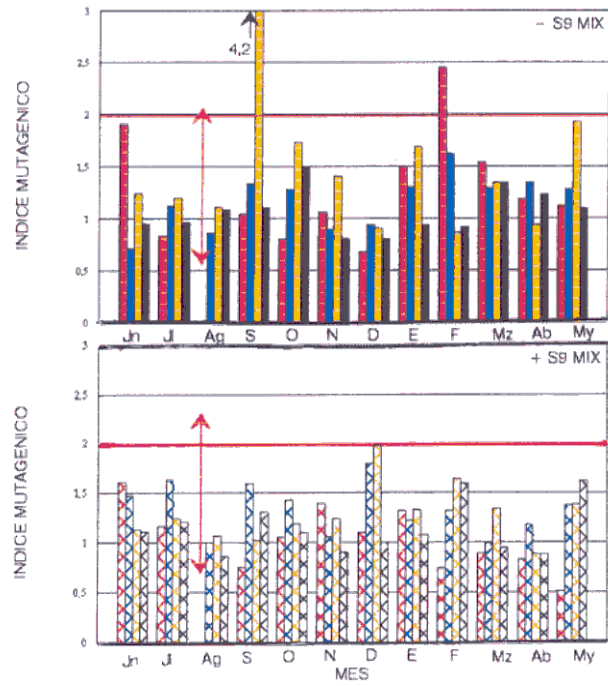
PUNTOS DE MUESTREO

ENSAYO 1, 2ª FRACCION

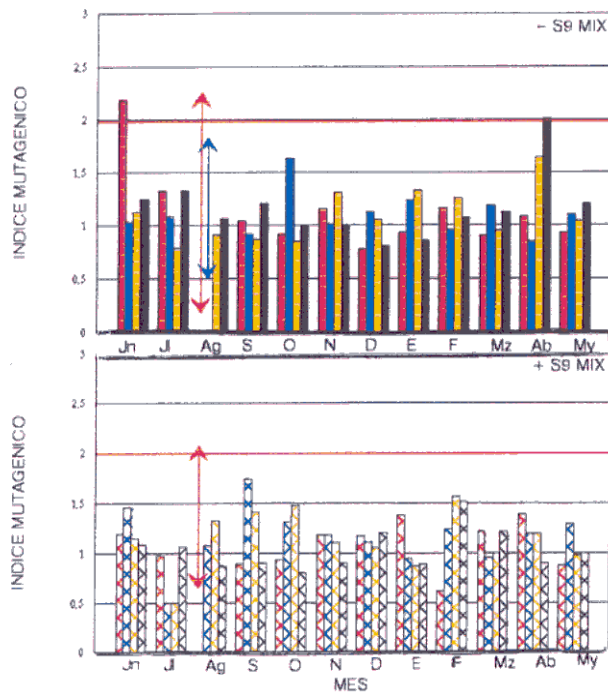
PUNTO 1



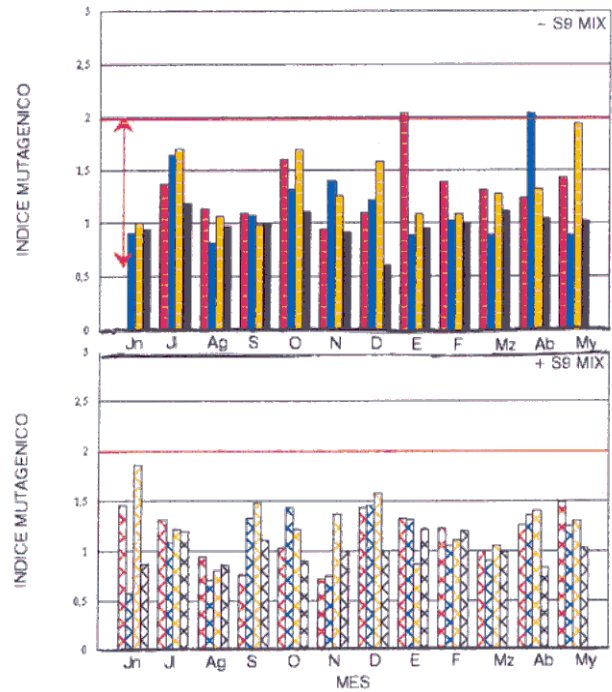
PUNTO 2



PUNTO 3



PUNTO 4



CEPA TA1535
CEPA TA98
CEPA TA1535
CEPA TA98

CEPA TA1538
CEPA TA100
CEPA TA1538
CEPA TA100

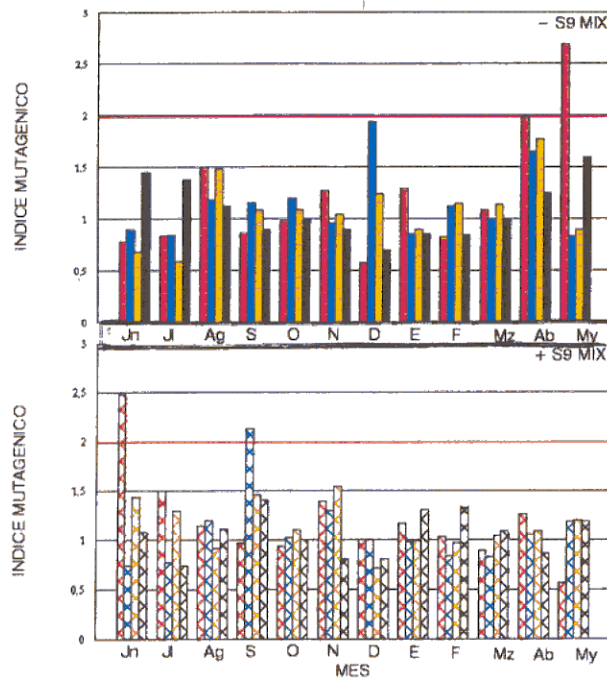
Figura 29.

MUESTRA TOXICA (no indica magnitud)
UMBRA DE MUTAGENICIDAD

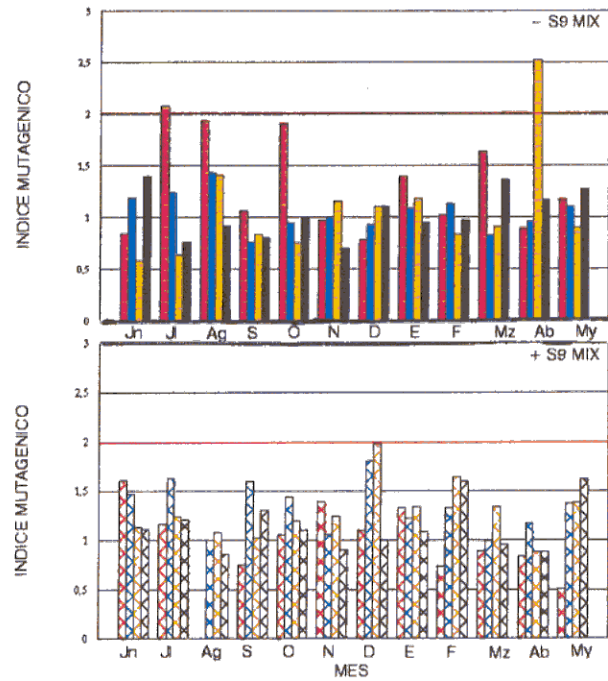
PUNTOS DE MUESTREO

ENSAYO 1, 3ª FRACCION

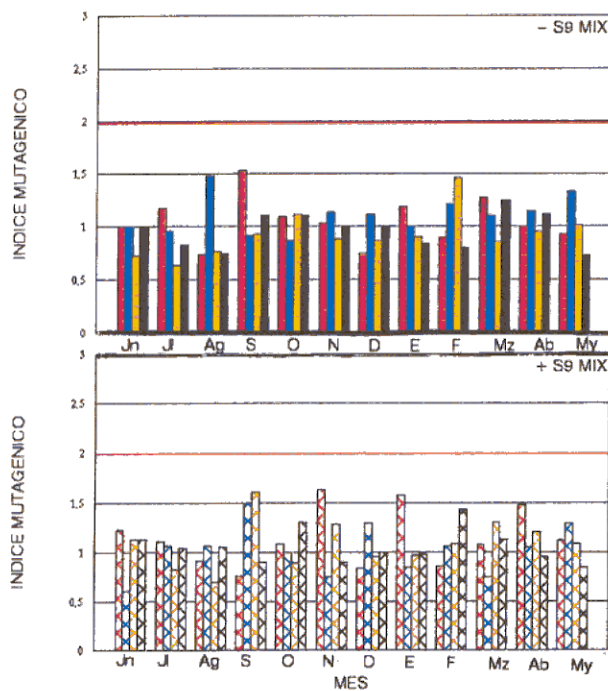
PUNTO 1



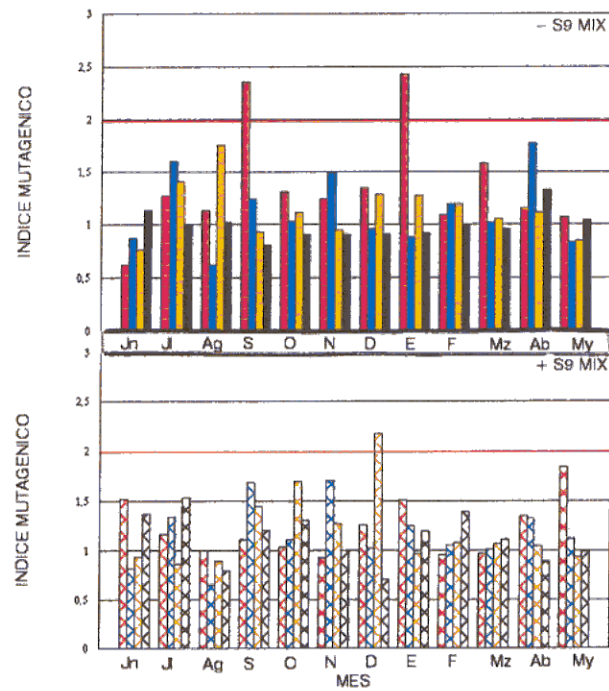
PUNTO 2



PUNTO 3



PUNTO 4



CEPA TA1535

CEPA TA98

CEPA TA1535

CEPA TA98

CEPA TA1538

CEPA TA100

CEPA TA1538

CEPA TA100



MUESTRA TOXICA (no indica magnitud)
UMBRAL DE MUTAGENICIDAD

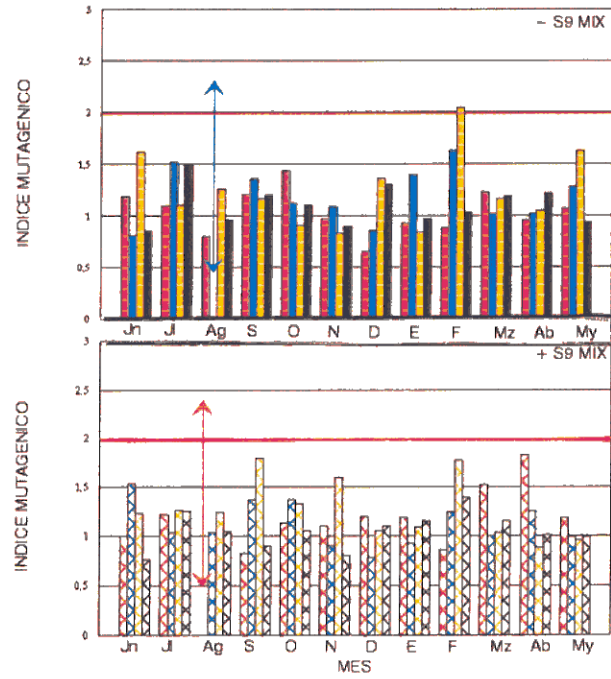
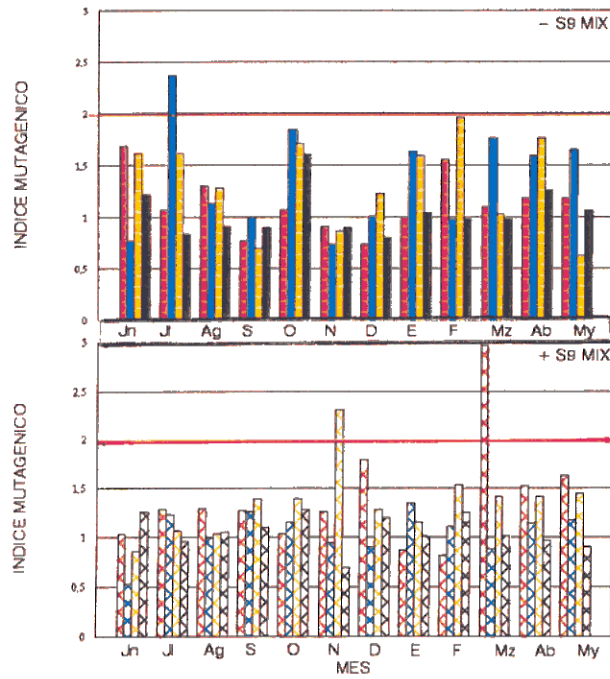
Figura 30.

PUNTOS DE MUESTREO

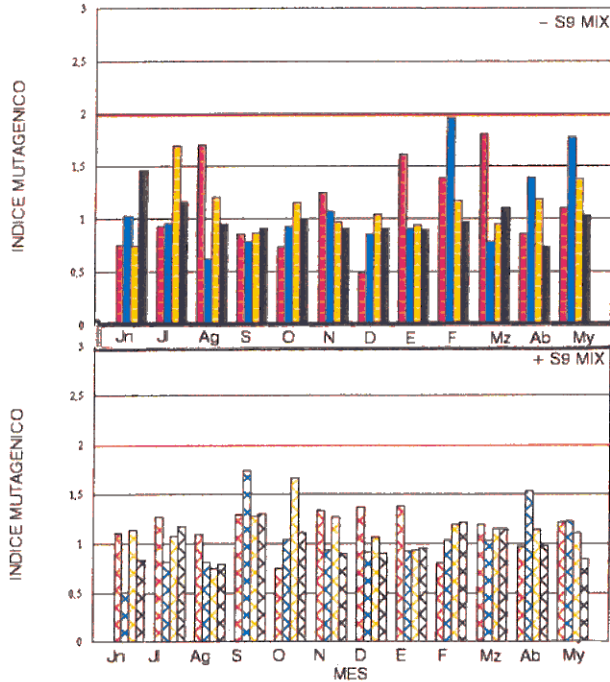
ENSAYO 1, PUNTO 5

1ª FRACCION

2ª FRACCION



3ª FRACCION



CEPA TA1535
CEPA TA98
CEPA TA1535
CEPA TA98

CEPA TA1538
CEPA TA100
CEPA TA1538
CEPA TA100

Figura 31.

MUESTRA TOXICA (no indica magnitud)
UMBRAL DE MUTAGENICIDAD

3.

ESTUDIO DE LA GENOTOXICIDAD POR CEPAS BACTERIANAS: ENSAYOS 1, 2 Y 3.

Para obtener una información mas completa de los resultados se analizan estos entorno al carácter genotóxico de las distintas muestras para cada una de las cepas bacterianas utilizadas.

3.1. CEPA TA 1535**Ensayo 1**

Los datos correspondientes al ensayo 1 llevado a cabo con la cepa TA 1535 aparecen en las Tablas básicas de la 1 - 7 y las Figuras 32, 33, 34.

1ª fracción (Fig. 32). Solo la muestra de P1/Ab es claramente genotóxica (3,28), correspondiendo el valor inferior siguiente a la muestra P2/J1 (1,95), consideranda como genotóxica dado el valor de IM alcanzado. En el P4/Jn se detecta toxicidad.

2ª fracción. (Fig. 33). La 2ª Fr de las muestras recogidas en Ag: P1, P2 y P3, y en Jn: P1 y P4, resultan ser tóxicas para ésta cepa TA 1535. Solo las muestras de Jn/P3 (2,19), E/P4 (2,04), F/P2 (2,45) y Ab/P1 (2,23) logran superar el valor de IM indicativo de carácter genotóxico ($IM \geq 2$), aunque con niveles poco elevados. Con la muestra de Jn/P2, se obtienen valores de IM muy próximos a los de genotoxicidad (1,91) por lo que se lo considera como tal.

3ª fracción. (Fig. 34). Existen 5 muestras cuya 3ªFr es genotóxica: My/P1 (2,69), Ab/P1 (1,98), E/P4 (2,43), S/P4 (2,36) y J1/P2 (2,07); y 2 muestras que rozan la genotoxicidd: Ag/P2 (1,93) y O/P2 (1,91). No hay ninguna muestra cuya 3ªFr denote carácter tóxico para esta cepa.

+S9

Al tratar las muestras correspondientes a las tres fracciones con S9, desaparece el carácter genotóxico de todas las muestras indicadas antes, transformándose en genotóxicas las correspondientes a P1/Jn/1^aFr (2,1) y P5/Mz/1^aFr (2,98), P1/Jn/3^aFr (2,48) y P2/Jn/3^aFr (2,0). El carácter tóxico detectado en las muestras P4/Jn/1^a y 2^aFr/ y P1/Ag/2^aFr, desaparece en la del P4 para ambas fracciones y se transforma en muestra con fuerte carácter genotóxico la correspondiente al P1/2^aFr (3,9). Sin embargo, la toxicidad de las muestras de Ag/2^a Fr: P1, P2 y P3 se mantiene, apareciendo además toxicidad en Ag/P5.

Ensayo 2

Tablas básicas: 1-5. Los datos obtenidos en el ensayo 2 (tras el almacenaje) corroboran la totalidad de resultados negativos obtenidos para la cepa TA 1535 en el ensayo 1, pero tan solo la toxicidad del P3/Ag/2^aFr/-S9 y el carácter genotóxico de las muestras del P2/Jl/3^aFr/-S9 (1,98) y P4/S/3^aFr/-S9 (1,93) y P5/Mz/1^aFr/ +S9 (2,41). En general, en todos los datos del ensayo 2 se observa una disminución del valor del IM respecto al ensayo 1, lo que indica pérdida parcial del carácter genotóxico (este mismo hecho sucede con otras muestras que no llegan a ser mutagénicas). Con el resto de las muestras cuyos resultados no eran coincidentes en ambos ensayos se realiza un 3º Ensayo (Tabla básica 6 y 7), con el que se obtiene resultados negativos en todos los casos.

Cuadro 6: Muestras genotóxicas ó tóxicas con respecto a la cepa TA 1535 (Ensayo 1)

		POSIBLES MUTAGENOS		MUTAGENOS POSITIVOS		TOXICIDAD	
		-S9-mix	+ S9- mix	-S9-mix	+ S9-mix	-S9-mix	+ S9-mix
1ªFRACCION	Nº casos/%	1/1,6		1/1,6	2/3,3	1/1,6	
	Punto/Mes	P2/Jl		P1/Ab	P1/Jn; P5/Mz	P4/Jn	
2ªFRACCION	Nº casos/%	1/1,6		4/6,6	1/1,6	5/8,3	4/6,6
	Punto/Mes	P2/Jn		P1/Ab; P2/F; P3/Jn; P4/E;	P1/Jn	P1/Jn y Ag; P2/Ag; P3/Ag; P4/Jn;	P1/Ag; P2/Ag; P3/Ag; P5/Ag
3ªFRACCION	Nº casos/%	3/5		4/6,6	2/3,3		
	Punto/Mes	P1/Ab; P2/Ag y O		P1/My; P2/Jl; P4/S y E	P1/Jn; P2/Jn		

Nº casos: nº de casos positivos en el ensayo

%: Porcentaje de casos positivos respecto del total (N=5 puntos x 12 meses = 60).

Punto: Punto de muestreo

Mes: Mes de recolección de la muestra

+ S9: Muestras tratadas con la fracción microsomal de extracto de hígado de rata

3.2. CEPA TA 1538

Ensayo 1

Los datos correspondientes al ensayo 1 llevado a cabo con la TA 1538 aparecen en las Tablas básicas 1-5 y Fig. 32, 33 y 34.

1ª fracción (Fig. 32). Esta cepa (TA 1538) es la más sensible a los mutágenos existentes en la 1ª Fr de las muestras y con la que se obtiene el mayor número de casos positivos. Resultan mutagénicas 1ªFr de las muestras del mes de J1 en los 5 puntos de muestreo: P1 (2,36), P2 (3,64), P3 (2,76), P4 (2,16) y P5 (2,36); del mes de S: P2 (2,22) y P4 (2,31), y de O/P4 (2,16), N/P4 (2,23) y My: P2 (2,25) y P4 (2,03). Se consideran como mutagénicas la 1ªFr de la muestra P1/Ag (1,95), P3/O (1,92), P5/O (1,84) y P1/F (1,92).

2ª fracción (Fig. 33). Solo se obtiene carácter genotóxico con la muestra de P4/Ab (2,04, genotóxico débil), e indicios de él en la P1/My (1,85).

Son tóxicas la 2ªFr de las muestras recogidas en Ag: P1, P3 y P5 (la 2ªFr/Ag:P1 y P3 también eran tóxicas para la cepa TA 1535).

3ª fracción. (Fig. 34). Los IM más altos se obtienen en las muestras de P1/D (1,94) y P5/F (1,98), si bien ambos valores no superan el valor indicativo de genotoxicidad (≥ 2), por lo que se pueden considerar muestras con componentes genotóxicos débiles. Los valores inmediatamente inferiores corresponden a los meses de My/P5 (1,78) y Ab: P1 (1,65) y P4 (1,78), los cuales muestran indicios de genotoxicidad. Las muestras de Ab: P1 y P4 corroboran su carácter genotóxico en la 2ª Fr de las muestras.

±S9

Al digerir las tres fracciones de las muestras con S9 (Figs. 32, 33 y 34) se pierde el carácter genotóxico y tóxico obtenido al realizar los ensayos sin -S9, excepto en las de la 1ª fr, del P2: J1 (2,3, convirtiéndose en mutágeno débil) y S (2,05), y del P4/N (2,29). Sin embargo, aumentan los IM en las tres fracciones de varias muestras superando el umbral indicativo de genotoxicidad únicamente en las muestras del mes de S: P3/1ªFr (2,0) y P1/3ªFr (2,13).

Ensayo 2

Tablas básicas 1-5. Al realizar el ensayo 2, se corroboran los resultados de todas las muestras que no tenían carácter genotóxico en el ensayo 1, y algunas de ellas que si muestran tal carácter: en P2: JI/1^aFr/-S9 (2,1) y My/1^aFr/-S9 (2,11), S/1^aFr/+S9 (2,0); en P3: JI/1^aFr/-S9 (2,11); en P4: N/1^aFr/+S9 (2,55), y Ab/2^aFr/-S9 (1,98) y por último P5: JI/1^aFr/-S9 (2,1). En general, aquellos casos que muestran cierto contenido genotóxico en el ensayo 2, sus IM son inferiores a los obtenidos en el ensayo 1, indicando pérdida parcial del contenido mutagénico tras el almacenaje. Con las muestras, cuyos resultados no coinciden tras realizar el ensayo 1 y 2, se lleva a cabo un 3º ensayo

Ensayo 3. Tablas básicas 6 y 7. Se obtienen resultados siempre negativos. lo que demuestra que las sustancias genotóxicas detectadas en el ensayo 1 son inestables y pierden progresivamente su carácter genotóxico.

Cuadro 7: Muestras genotóxicas o tóxicas con respecto a la cepa TA 1538 (Ensayo 1)

		POSIBLES MUTAGENOS		MUTAGENOS POSITIVOS		TOXICIDAD	
		-S9-mix	+ S9-mix	-S9-mix	+ S9-mix	-S9-mix	+ S9-mix
1ª FRACCION	Nº casos/%	3/5		14/23,3	4/6,6		
	Punto/Mes	P1/Ab; P4/Ab; P5/O		P1/Jl, Ag y F; P2/Jl,S y My; P3/Jl y O; P4/Jl,S,O,N y My; P5/Jl;	P2/Jl y S; P3/S; P4/N;		
2ª FRACCION	Nº casos/%	1/1,16		2/3,3		P3/5	
	Punto/Mes	P1/My		P1/Ab; P4/Ab;		P1/Ag; P3/Ag; P5/Ag;	
3ª FRACCION	Nº casos/%			2/2,3	1/1,6		
	Punto/Mes			P1/D; P5/F;	P1/S;		

Nº casos: nº de casos positivos en el ensayo.

%: Porcentaje de casos positivos respecto del total (N = 5 puntos x 12 = 60).

Punto: Punto de muestreo

Mes: Mes de recolección de la muestra

+ S9: Muestras tratadas con la fracción microsomal de extracto de hígado de rata

3.3 CEPA TA 98

Ensayo 1

Los datos numéricos se presentan en las Tablas básicas 1-5, y Figs. 32, 33 y 34.

1ª fracción. (Fig. 32). En esta fracción se detecta el genotóxico mas potente obtenido en el estudio, correspondiente a P1/F/-S9 (5,56). La muestra de P1/Ab/-S9 (2,81) también es genotóxica, observandose el mismo carácter para la cepa TA 1535. Por último la muestra de P2/J1 (2,31), resulta mutagénica para las cepas TA 98 y TA 1538 (ambas cepas detectan mutágenos del tipo "frameshift", pero la genotoxicidad para la TA 1538 que carece del factor R, es considerablemente superior, 3,64). El resto de las muestras no sobrepasan el umbral mutagénico, aunque algunas se sitúan próximas a él: P4/O (1,87) y P5/F (1,96) considerando éste último como tal.

2ª fracción. (Fig. 23). Con esta fracción de la muestra también se obtienen IM elevados como en la de la 1ªFr, lo que denota su carácter de mutágenos fuertes: P2/S (4,2) y P1/F (4,94). Como se ha visto, la 1ªFr de las muestras recogidas en estos meses S y F, también son mutagénicas para la cepa TA 98. Por otra parte con la 2ªFr de la muestra de P5/F (2,05) se sobrepasa el umbral indicativo de mutagenicidad (≥ 2), cuando con la 1ªFr solo se alcanzaba el valor límite) y se sitúan ligeramente por debajo de él, las muestras de P1/Ab/2ªFr (1,94, mutagénico en la 1ª Fr) y P2/My/2ªFr (1,93), considerandolas mutagénicas débiles. Por último la 2ªFr de las, muestras P4/My (1,77) y P1/O (1,85) presentan indicios de sustancias genotóxicas entre sus componentes, ya que con ellas se obtienen IM elevados respecto a los valores controles, pero sin sobrepasar el umbral de la genotoxicidad.

3ª fracción (Fig. 24). Unicamente se observa carácter genotóxico en la muestra de P2/Ab (2,52), y hay un ligero aumento de los I.M. respecto a los valores controles en P1/Ab (1,77) y P4/Ag (1,76).

±S9

Al digerir las muestras con el extracto microsomal S9 (Figs. 32, 33 y 34), desaparece el carácter claramente genotóxico o que rozaban la genotoxicidad de las

1^aFr , 2^aFr y 3^aFr de las muestras, y solo en la de $\text{P5/F/}2^a\text{Fr}$ (1,77), el valor de IM desciende considerablemente menos, aunque también por debajo de umbral de mutagenicidad. Por otro lado, aparece poder genotóxico en la 1^aFr/N : P4 (2,27) y P5 (2,31), y aumentan considerablemente los I.M de las tres fracciones de las muestras recogidas en P2 en distintos meses, alcanzando en ocasiones el umbral indicativo de mutagenicidad (≥ 2): 1^aFr : S (1,96), O (1,87) y D (1,96); 2^aFr : D (1,98) y 3^aFr O (2,03). Además adquiere carácter genotóxico la 3^aFr/P4/D (2,17) y aumenta, el IM sin alcanzar el umbral mutagénico la 2^aFr/P4/Jn (1,86).

Ensayo 2

Tablas básicas 1-5. Los resultados obtenidos en este ensayo para la cepa TA 98, confirman el carácter no genotóxico de casi todas las muestras que se manifestaron como tales en el ensayo 1, tras el almacenaje: la 1^aFr/P2/S/-S9 adquirió carácter genotóxico (2,51) y las 3^aFr/S/-S9 de los P2 y P3 , carácter tóxico. Por último, sin superar el umbral indicativo de genotoxicidad, aumentan los IM respecto al ensayo 1 de 2^aFr/P1/S/-S9 (1,86) y 1^aFr/P1/O/+S9 (1,85). Por otra parte, aun en aquellas muestras que mantuvieron cierto carácter genotóxico, siempre disminuyó el valor del IM por debajo del umbral de mutagenicidad, indicando pérdida parcial del carácter genotóxico tras el almacenaje: P2 : 1^aFr/Jl/-S9 (1,72); 2^aFr/S/+S9 (1,91) y 3^aFr/Ab/-S9 (1,86) y P1 : 1^aFr/Ab/-S9 (1,71) y 2^aFr/Ab/-S9 (1,83).

Ensayo 3

Se realizó un Ensayo 3 (Tablas básicas 6 y 7) con todas las muestras con resultados no coincidentes en el 1º y 2º ensayo, incluyendo aquellas que tenían pérdida parcial del carácter genotóxico. Los resultados del ensayo 3 mostrarán un notable descenso de los IM en todas los casos, desapareciendo siempre la genotoxicidad.

Cuadro 8: Muestras genotóxicas o tóxicas con respecto a la cepa TA 98 (Ensayo 1)

		POSIBLES MUTAGENOS		MUTAGENOS POSITIVOS		TOXICIDAD	
		-S9-mix	+ S9-mix	-S9-mix	+ S9-mix	-S9-mix	+ S9-mix
1ª FRACCIÓN	Nº casos/%	3/5	3/5	4/6,6	2/3,3		
	Punto/Mes	P3/Jl; P4/Jl y O	P2/S, O y D;	P1/F y Ab; P2/Jl; P5/F	P4/N; P5/N;		
2ª FRACCIÓN	Nº casos/%	1/1,6	1/1,6	6/10	1/1,6		
	Punto/Mes	P1/O	P4/Jn;	P1/F y Ab; P2/S y My; P4/My; P5/F;	P2/D		
3ª FRACCIÓN	Nº casos/%			1/1,6	2/3,3		
	Punto/Mes			P2/Ab;	P2/O; P4/D;		

Nº casos: nº de casos positivo en el ensayo

%: Porcentaje de casos positivos respecto del total (N = 5 puntos x 12 meses = 60)

Punto: Punto de muestreo

Mes: Mes de recolección de la muestra

+ S9: Muestras tratadas con la fracción microsomal de extracto de hígado de rata

3.4. CEPA TA 100

Ensayo 1

Los datos correspondientes al Ensayo 1 se muestran en las Tablas básicas 1-5, y las Figuras 32, 33 y 34). La 1ª, 2ª y 3ª Fr de las muestras recogidas a lo largo de todo el año de muestreo, no provocan cambios mutacionales en la cepa TA 100, excepto la 2ªFr/P3/Ab/-S9 (2,01) que se comporta como un mutagéno débil. Con el resto de las muestras se obtiene en general IM poco elevados, sobrepasando el valor de 1,5, únicamente las muestras de 1ªFr/P5/O/-S9 (1,6); 2ªFr: P2/O/-S9 (1,5) y P1/Ab/-S9 (1,57) y 3ªFr/P1/My/-S9 (1,59).

+S9

Al digerir las muestras con la fracción microsomal S9, desapareció el carácter genotóxico detectado en la 2ªFr/P3/Ab. Por otro lado, hubo un descenso general de los IM, obteniéndose en la mayoría de los casos valores próximos a los controles, y superando el valor de 1,5 solamente las muestras de la 1ªFr: P1/S (1,7) y P1/F (1,57), P2/F (1,62) y P3/F (1,57), las de la 2ªFr: P1/O (1,8), P2/F (1,6) y P2/My (1,62) y las de la 3ªFr: P2/Jn (1,59) y P4/Jl (1,53).

Ensayo 2

Tablas básicas 1-5. Se confirman los resultados del ensayo 1, tanto los negativos como el único positivo que se obtuvo para la cepa TA100/2ªFr/P3/Ab/-S9, lo que demuestra que se trata de un mutágeno con una estabilidad mínima de 4 semanas.

Cuadro 9: Muestras genotóxicas o tóxicas con respecto a la cepa TA 100 (Ensayo 1)

		POSIBLES MUTAGENOS		MUTAGENOS POSITIVOS		TOXICIDAD	
		-S9-mix	+ S9-mix	-S9-mix	+ S9-mix	-S9-mix	+ S9-mix
1ª FRACCIÓN	Nº casos/%						
	Punto/Mes						
2ª FRACCIÓN	Nº casos/%			1/1,6			
	Punto/Mes			P3/Ab			
3ª FRACCIÓN	Nº casos/%						
	Punto/Mes						

Nº casos: nº de casos positivo en el ensayo

%: Porcentaje de casos positivos respecto del total (N = 5 puntos x 12 meses = 60)

Punto: Punto de muestreo

Mes: Mes de recolección de la muestra

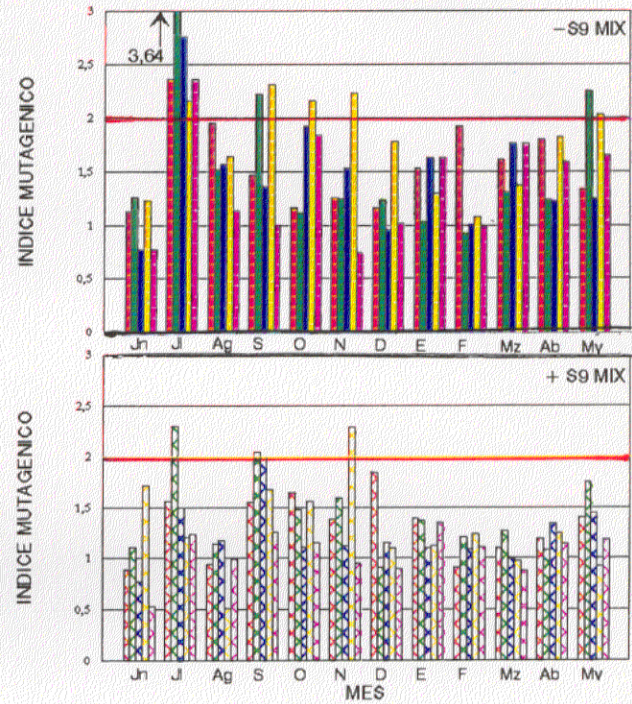
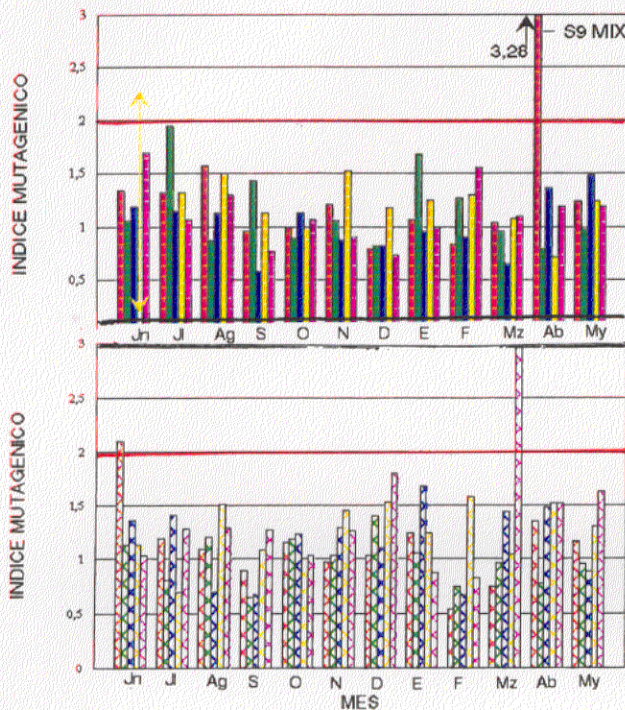
+ S9: Muestras tratadas con la fracción microsomal de extracto de hígado de rata

CEPAS BACTERIANAS

ENSAYO 1, 1ª FRACCION

CEPA TA1535

CEPA TA1538



CEPA TA98

CEPA TA100

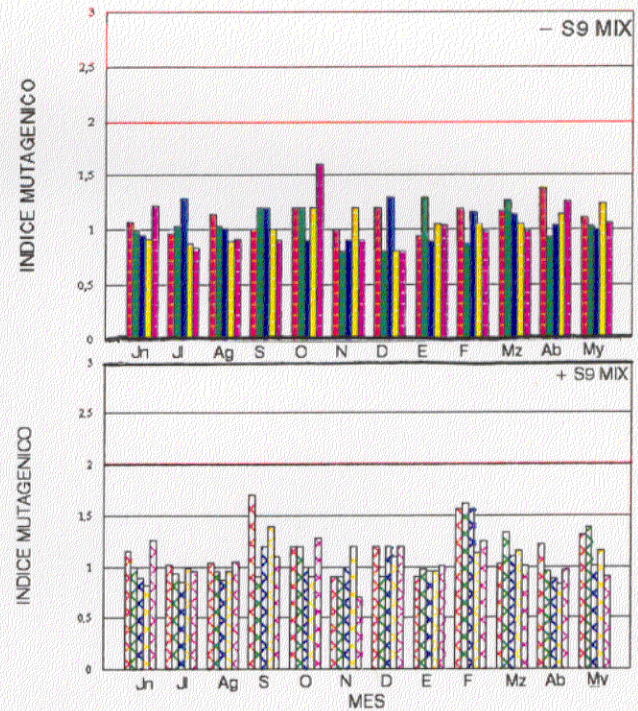
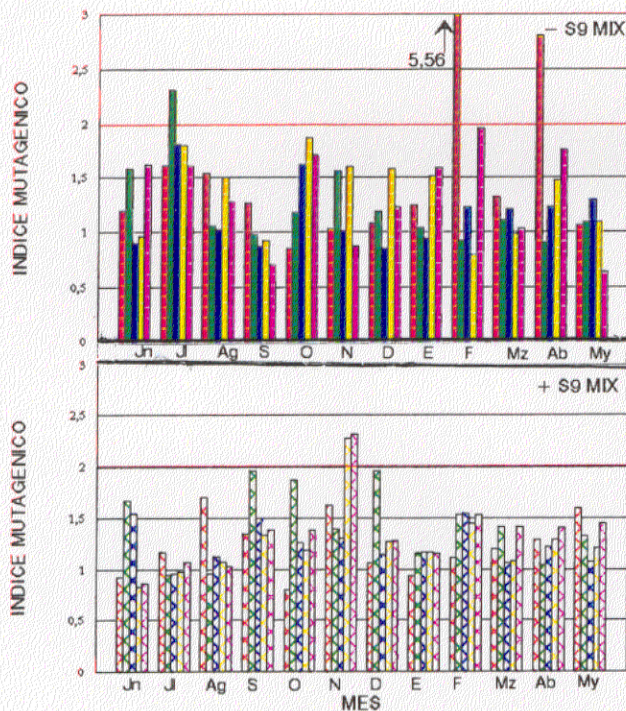


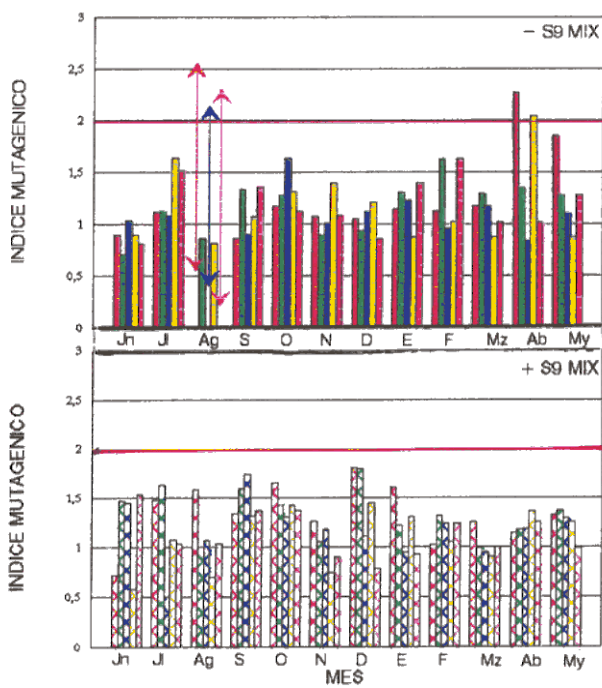
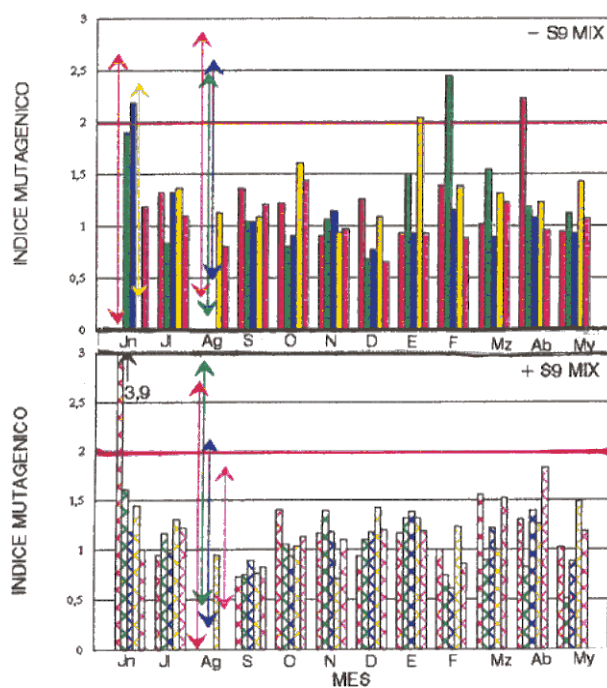
Figura 32. MUESTRA TOXICA (no indica magnitud) UMBRAL DE MUTAGENICIDAD

CEPAS BACTERIANAS

ENSAYO, 2ª FRACCION

CEPA TA1535

CEPA TA1538



CEPA TA98

CEPA TA100

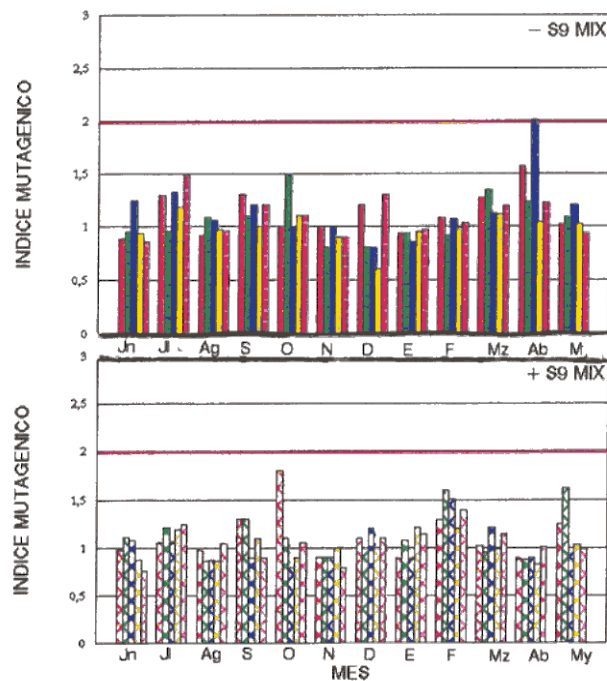
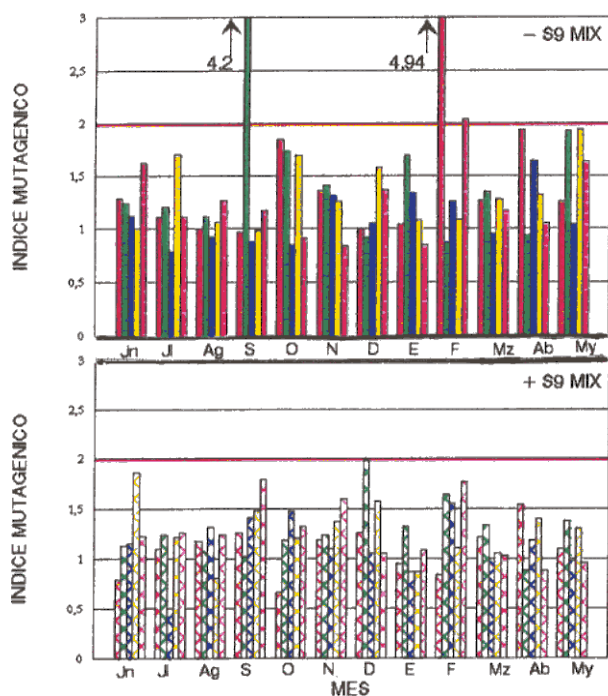


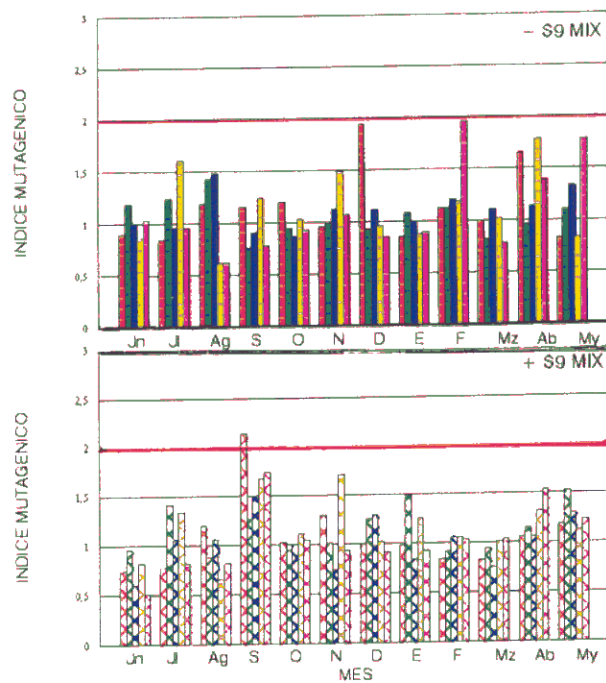
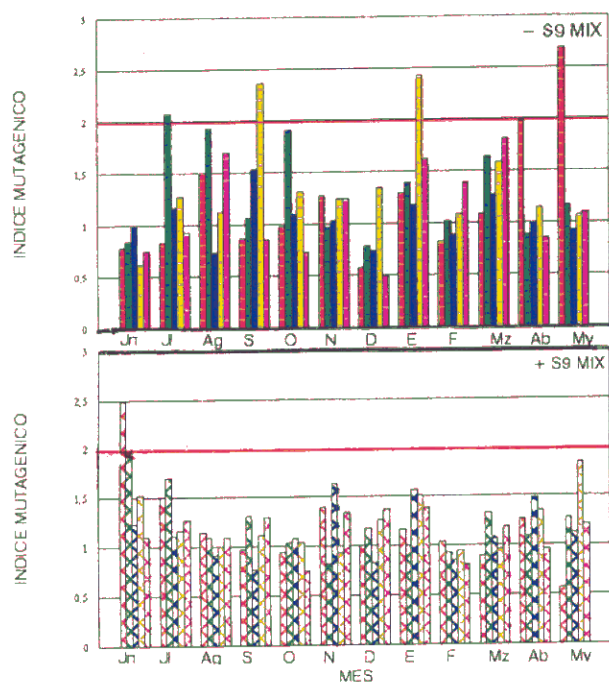
Figura 33.

CEPAS BACTERIANAS

ENSAYO 1, 3ª FRACCION

CEPA TA1535

CEPA TA1538



CEPA TA98

CEPA TA100

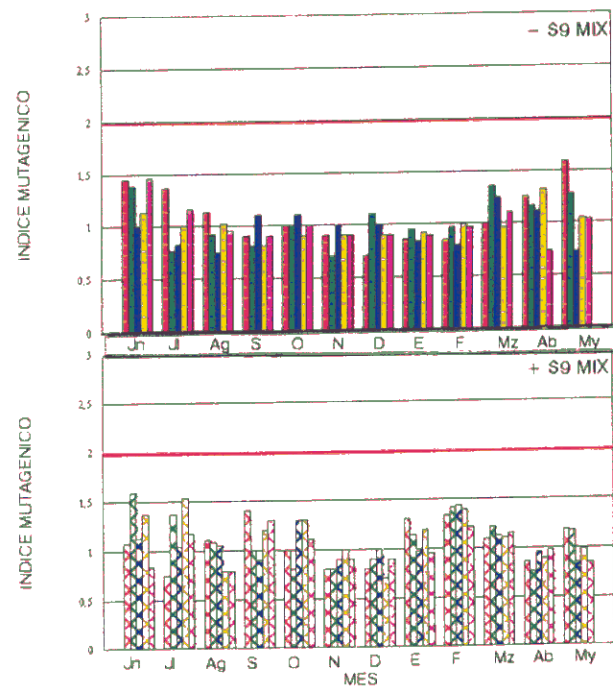
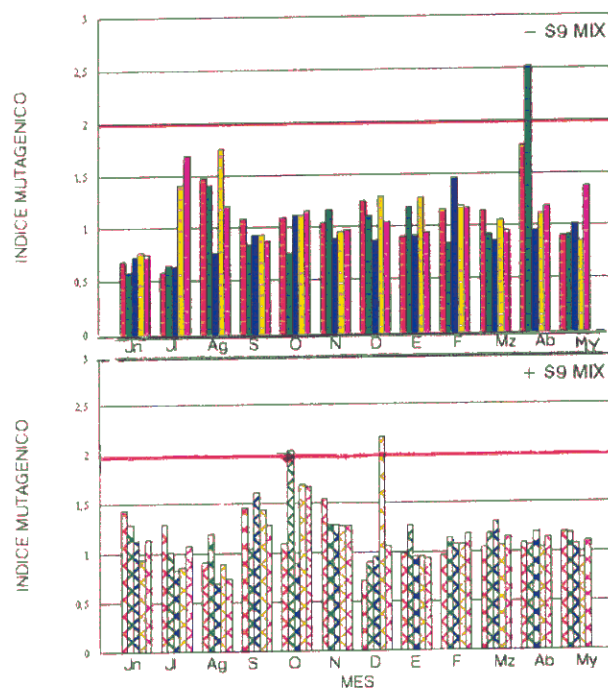


Figura 34.

VI- DISCUSIÓN

En este trabajo se realizó un estudio de genotoxicidad en las aguas del río Tajo a su paso por la Comunidad Autónoma de Castilla-La Mancha, con el propósito de establecer un método rápido, eficaz y adaptado a las características específicas del río, para detectar la presencia de posibles sustancias genotóxicas. *A priori* se preveía la existencia de compuestos genotóxicos en las aguas del río en esta zona, dada la cantidad de vertidos recogidos por su cauce, y la aparición en repetidas ocasiones de peces muertos. La época de realización del presente estudio coincidió con la mortandad de peces, y el compuesto causante de ella, fue identificado por el equipo de investigación del centro de Sanidad Ambiental del INIA (Muñoz y col. 1994).

Para establecer un método de control periódico de calidad de las aguas del río, se procedió, en primer lugar, a concentrar las muestras a fin de concentrar los posibles compuestos genotóxicos presentes en las aguas, y posteriormente se realizó el Test de Ames (Ames y cols. 1975). El Test de Ames es un ensayo "*in vitro*" rápido, sensible, preciso y poco costoso, homologado por la OCDE y la CEE, y recomendado por numerosos investigadores (Ashby, 1986; Dellarco y col. 1986 y Dearfield y col. 1991, etc.) como método inicial de una batería de ensayos de genotoxicidad, a ser realizados "*in vitro*" e "*in vivo*", con organismos procariotas y eucariotas. Al desarrollar el Test de Ames sobre un producto químico existente, ó de nueva síntesis se puede emitir un primer juicio sobre el carácter genotóxico de la sustancia investigada. Por otro lado, el Test de Ames ha sido propuesto como método de vigilancia de vertidos para su evaluación y caracterización toxicológica previa a su liberación a los ríos, a fin de dar cumplimiento a lo estipulado en el punto 4 de la Lista 1 de la Reglamentación de Vertidos: "no contener productos cancerígenos en más de un 0,01% de acuerdo con la IARC (International Agency for Research on Cancer)". Dada la alta correlación existente en la mayoría de sustancias químicas entre su carácter mutagénico y carcinogénico permite que los resultados de los ensayos de genotoxicidad sirvan en parte para cumplimiento a lo estipulado en el mencionado punto 4, (apartado 3.1. de la introducción), ya que existe una imposibilidad de realizar los ensayos de experimentación animal con cada compuesto químico, por el tiempo

que conlleva, el elevado número de animales que supone y su elevado coste.

La actual Legislación de Vertidos RD. 849/1986 (BOE, 1986), considera a éstos como una unidad, clasificándolos como "sustancias que pertenecen a las Lista I y II del anexo a dicho R.D.", sin considerar el grave problema que generan las mezclas complejas de compuestos químicos, los cuales necesitan ser evaluados como tales mezclas, y no como sustancias químicas individuales, pues los distintos compuestos pueden potenciar o antagonizar sus acciones tóxicas entre si.

La imposibilidad a la hora de poder evaluar todas los compuestos existentes en las aguas de los ríos, y menos aún las posibles mezclas complejas, hace que lo único racionalmente posible para controlar mejor la calidad de las aguas de los ríos, sea exigir a cada responsable del vertido, la caracterización toxicológica del mismo previa a la autorización para ser liberado al río, evitando así daños posteriores (y en ocasiones irreparables) al hombre y al medio ambiente (de la Fuente y Frutos, 1995).

Posteriormente a la evaluación y/o caracterización inicial de una sustancia química o de un vertido mediante el test de Ames, se deben aplicar otros ensayos genotóxicos, ó identificar la sustancia del riesgo en las mezclas complejas, mediante técnicas instrumentales convencionales.

En el presente estudio, al aplicar el Test de Ames a las muestras obtenidas, se ha detectado que las aguas del río Tajo contienen agentes ó sustancias genotóxicas a lo largo de todo el cauce estudiado. El ensayo 1 es al que nos vamos a referir primordialmente en esta discusión, por ser sus resultados los mas representativos del estado del agua en el momento en que se efectuó la toma de muestras. Al ser los componentes químicos integrantes de los vertidos en general bastante reactivos, durante el almacenaje se puede modificar el carácter genotóxico inicial en un periodo corto de tiempo (y de hecho ocurrió en varias ocasiones). De las 1440 extractos de muestras ensayados, el 6,38% presentaron carácter genotóxico; de ellos, 79 indujeron reversión bacteriana de las cepas utilizadas, y 13 eran tóxicos, causando la muerte de

las bacterias. La cantidad de muestras con caracter genotóxico puede parecer escasa, sin embargo, el hecho de conocer con exactitud que el río Tajo lleva en sus aguas componentes genotóxicos es de vital importancia y proyección en biología, en la consideración del riesgo que puede suponer para el hombre y el medio ambiente, el uso inadecuado de sus aguas (consumo, como agua potable, agricultura, pesca, recreo etc.), a corto y/o largo plazo. Por otro lado, conocer las características genotóxicas del río permite a las autoridades competentes mantener un control estricto sobre sus aguas y los vertidos que a ellas se emiten, pudiendo tomar las decisiones necesarias y oportunas en cada momento, para impedir el daño o subsanarlo en caso de que éste se produzca.

El caracter genotóxico, la naturaleza y la estabilidad de los compuestos químicos responsables de este caracter, no es igual en todas las zonas del río, ni en todas las épocas del año. En general, las muestras genotóxicas detectadas en los meses de otoño e invierno son menos numerosas que en los meses de primavera y verano, con la excepción de algunas muestras aisladas, recogidas en los puntos 1, 2 y 4 durante los meses invernales, debido probablemente a descargas ocasionales (Tablas 1-5 y Fig. 23-27). Estos datos parecen indicar que el aumento de genotóxicos en las aguas del río Tajo está ligado al aumento de las temperaturas. Su cuantía empieza a incrementarse en marzo, se alcanzan los valores máximos en julio y agosto y de nuevo empiezan a disminuir en septiembre. Igualmente, las muestras tóxicas se registran siempre en el verano, y la mayoría de ellas en el mes de agosto. Este patrón estacional, está en concordancia con las datos obtenidos por otros investigadores (Singer y cols. 1981; Hoehn y cols. 1984; Veenstra y Schnoor, 1980 y Wetzel, 1983). Además, Singer y cols. (1981) apuntan que la elevación de los valores de contaminación en ésta época del año son debidos al aumento de la descomposición de la materia orgánica, ya que al aumentar la productividad biológica primaria (algas, macrofitos, bacterias), al elevarse las temperaturas se incrementa el número de sustancias a reaccionar. En nuestro caso, a este hecho se suman la inexistencia de lluvia que concentra las muestras, (Figs. 13-19) y la recepción de vertidos muy diversos, lo que aumenta considerablemente las reacciones químicas no deseables.

Además los vertidos aunque se suceden a lo largo de todo el año, normalmente se incrementan en épocas próximas a las vacaciones estivales debido por ejemplo a las limpiezas de mantenimiento de las fábricas.

En cuanto al curso del río estudiado, hemos observado presencia de sustancias genotóxicas en todos los puntos de muestreo (Descripción del área de estudio, pág. 68), si bien existen puntos donde se detectan un mayor número de muestras mensuales con carácter genotóxico, siendo algunas de gran potencia. Los puntos 1 y 2 son los mas contaminados acumulando el 26,08% y el 23,9% respectivamente de la totalidad de muestras genotóxicas, seguidos por el P4 con un 20,6%, el P5 con un 13,04% y por último el P3 9,78%. El hecho de que P1 y P2 sean los más contaminados concuerda con lo esperado dada su ubicación. En esta zona del río afluyen, los vertidos de nucleos de población importantes como Aranjuez, Toledo y Talavera de la Reina, con sus correspondientes industrias, así como los ríos Jarama y Guadarrama, a los que van a parar las aguas residuales industriales de gran parte de la Comunidad de Madrid. por otra parte, la mayoría de estos vertidos (como los del resto del área de estudio) se liberan directamente al río, sin sufrir ningún tipo de tratamiento medianamente específico para la naturaleza de cada tipo de vertido. Las plantas de tratamiento existentes en la zona son convencionales, con tratamientos únicamente primarios y secundarios, y reciben conjuntamente aguas: residuales urbanas e industriales. Nemerow, (1977) ya indicaba la total improcedencia de mezclar en tratamientos conjuntos, vertidos industriales de origen farmacéutico, con vertidos de aguas residuales urbanas, a no ser que se hubiera considerado anteriormente la carga extra de DBO.

Como indican diversos autores (Tedeschi, 1985; Stahl, 1991), los tratamientos primarios y secundarios de las aguas residuales urbanas pueden ser suficientes en determinadas circunstancias, dependiendo del origen del contaminante y del uso posterior que se vaya a dar al agua. Sin embargo, las aguas residuales industriales tienen concentraciones mayores de residuos y en muchas ocasiones compuestos que inhiben procesos de tratamiento biológico, impidiéndose la degradación de la materia

orgánica. Por otro lado, los tratamientos secundarios convencionales no pueden aplicarse a todas las clases de aguas residuales. Para eliminar coloides, derivados del nitrógeno, fosfatos o materia orgánica refractaria a los procesos convencionales habría que utilizar técnicas más sofisticadas (Tedeschi, 1985), las cuales, como hemos indicado anteriormente, no se aplicaban en la mayor parte de los vertidos emitidos a la cuenca del río Tajo en el momento de realización de los muestreos. A este respecto hemos de mencionar que se disponía para la valoración de este trabajo, de los valores de índice de calidad de las aguas muestreadas (Tabla 1), para algunos parámetros (fosfatos, amonio, conductividad, turbidez, etc.), los cuales para determinadas muestras de agua de distintos puntos y/o meses de muestreo, se encontraban en concentraciones por encima de los límites establecidos para aguas prepotables (BOE/1988c). Por último, indicaremos que existen ensayos de genotoxicidad realizados con muestras recogidas a la salida de efluentes de plantas de tratamiento de aguas residuales, cuyos resultados dieron positivos (Waters y cols. 1989 y Filipic, 1995), lo cual confirma la ineficacia en ocasiones, de los tratamientos utilizados.

La genotoxicidad detectada en muestras del P4, no era la esperada, ya que este punto está en una zona no industrializada (después del embalse de Valdecañas), con dos únicos vertidos urbanos (uno de ellos con depuración) reconocidos por el MOPU, por tanto, esto parece indicar la existencia de algún otro vertido descontrolado. La toma de muestras en este punto se hizo con el propósito de conocer la calidad de las aguas desde el punto de vista genotóxico, una vez que éstas habían atravesado la Comunidad de Castilla-La Mancha y se introducían en la de Extremadura. Por otro lado, en el P4 se detecta también una mayor actividad genotóxica en los meses de otoño e invierno, a excepción de lo que ocurre en el resto del tramo del Tajo estudiado.

En los puntos 3 y 5, era previsible la presencia de sustancias genotóxicas, pues aunque no están situados en zonas tan industrializadas como los puntos 1 y 2, sí existen en ellos prácticas agrícolas y ganaderas, empresas dedicadas a la construcción, y numerosos vertidos urbanos de poblaciones pequeñas, con lo que de nuevo aquí se

estable una relación clara entre el número de vertidos, su complejidad y la respuesta genotóxica. En estos puntos de muestreo el porcentaje de muestras con carácter genotóxico y tóxico disminuye considerablemente en relación a P1 y P2, lo cual indica que en ellos hay menor cuantía de productos genotóxico y que están menos concentrados, siendo probablemente su naturaleza también distinta dado que los orígenes de los vertidos son mas concretos.

Una vez detectado el carácter genotóxico de algunas muestras, se pretende informar de algunas características de sus posibles genotóxicos basándonos en la cepa bacteriana que lo detecta, la fracción en la que se extrae y el punto de muestreo donde se recoge la muestra (vertidos emitidos en la zona). Las cepas TA 1535 , TA 100, TA 1538 y TA 98 de *Salmonella typhimurium*, son las mas utilizadas y recomendadas por numerosos autores, entre ellos Ames y col (1975) y de Serres y Shelby (1979), para realizar estudios de mutagénesis en aguas continentales. Las muestras son genotóxicas para la cepa TA 1535 en un 33,69%, para TA 1538 en un 32,6% y para TA 98 en un 26,08%. La cepa TA 100 es claramente menos sensible a los mutágenos existentes en las aguas de este área de estudio, manifestando su sensibilidad únicamente (en un 1,08%) frente a una muestra del P3 no digerida con activación metabólica S9.

En todos los puntos de muestreo, se recogen algunas muestras tóxicas para las cepas TA 1535 (10) y TA 1538 (3), siendo el P1 donde se detectaron un mayor número de ellas, siempre en los meses de verano, principalmente en agosto. La genotoxicidad al igual que la toxicidad se detecta mayoritariamente en las muestras no digeridas con S9. Por tanto, los procesos de detoxificación en mamíferos parece ser efectivo para inactivarlas. La cepa TA 1535 es la que revierte en mas ocasiones, cuando las muestras de agua del P1 y P5 son ensayadas con activación metabólica S9, seguida de la TA 98 para las del P2 y por último la cepa TA 1538 en las de P1, P2 y P3, lo cual indica la presencia de promutágenos en las aguas muestreadas en éstos puntos.

Al detectar genotoxicidad en muestras que han sido sometidas o no al proceso de digestión metabólica con S9 procedentes de todos los puntos, con cepas sensibles a genotóxicos de características estructurales distintas, se pone de manifiesto la supuesta complejidad de las muestras, dada la diversidad de vertidos directos o con tratamientos insuficientes, emitidos al río en este área de estudio.

Algunos autores han propugnado que para estudios de genotoxicidad rutinarios es suficiente llevar a cabo los análisis utilizando solo dos cepas, la cepa TA 98 y TA 100 (Brown y Donnelly, 1984; Kamiya y Ose, 1987; Cerná y col. 1991; Lemos y col. 1994 y Filipic, 1995). Ellos justifican esta afirmación por que ambas cepas son sensibles (TA 98 y TA 100) a los mismos mutágenos que causan la reversión bacteriana de las cepas TA 1535 y TA 1538 respectivamente. Incluso en las cepas primeras se aumentan las mutaciones espontáneas e inducidas, al incrementarse los errores en el sistema de reparación de estos organismos por poseer ambas el factor R. Sin embargo, nuestros resultados refutan esta afirmación, ya que las cepas con las que obtenemos mayor respuesta genotóxica son la TA 1535 y TA 1538 (Cuadros 6 y 7), por tanto si en el estudio del río Tajo se siguieran las recomendaciones propugnadas por dichos autores, no habiéramos detectado en gran parte de los casos el carácter genotóxico de las muestras, algunos de los cuales eran potentes; y tampoco habiéramos podido detectar el carácter tóxico de las mismas, pues todas ellas lo fueron para las cepas TA 1535 y TA 1538.

La consideración de la naturaleza compleja de las muestras de agua del río Tajo procedentes de diversas industrias (hidrocarburos, colorantes, aminas, amidas, ácidos húmicos etc.) formada por multitud de compuestos con estructuras diferentes, y que interraccionan entre si, nos indujo a no limitar, el estudio a las cepas TA 98 y TA 100. A éste respecto, McCann y col. (1975) recomiendan utilizar conjuntamente las cepas TA 1535 y TA 100, pues la 1ª, al poseer una mutación espontánea considerablemente inferior a la de la cepa TA 100, puede resultar en ocasiones más conveniente y es mas sensible y por tanto en ocasiones mas conveniente para detectar mutagenos que no son capaces de revertir a la TA 100.

Nuestros resultados indican que para el estudio de muestras complejas con componentes desconocidos los ensayos mutagénicos no pueden limitarse a las cepas TA 98 y TA 100, pues aunque la mutación básica es la misma para ambos pares de cepas (hisG46 para la TA 1535 y TA 100 y hisD3052 para TA 1538 y TA 98), el factor R (plasmidio pKM101) confiere a las bacterias que lo poseen una característica específica, al introducir un error en el sistema de reparación del DNA, incrementándose la mutación espontánea e inducida, para una gama alta de productos químicos, pudiendo deberse ésta a la propia labilidad del plasmidio. Según esto las cepas con factor R son mas eficaces que las que carecen de él. Sin embargo, en ocasiones algunos mutagenos pueden no afectar a la sensibilidad bacteriana que proporciona la presencia del factor R, resultando entonces mas eficaz la cepa que carece de él, al tener una mutación espontánea más baja.

Los casos en los que se detecta genotoxicidad para las cepas con la misma mutación básica pero que difieren en la presencia o no del Factor R son: cepas TA 1535, 31 casos y TA 100, 1 caso (Cuadros 6 y 9); y cepas TA 1538, 30 casos y TA 98, 24 casos (Cuadros, 7 y 8). Aunque es la cepa TA 1535 la que detecta mayor número de muestras genotóxicas en casi todos los puntos del río, a excepción de P2 y P4 donde las cepas más afectadas son la TA 98 (P2) y TA 1538 (P4), los resultados indican que en el área de estudio predominan o son detectados mas eficazmente los mutágenos "frameshift". Esto es debido a que dichos mutágenos parecen superiores en número al detectarse con las cepas TA 1538 y TA 98, pudiendose deberse al mismo mutágeno o a otro distinto.

Por otro lado, las muestras con actividad mutagénica para la TA 1535 y TA 100, se detectan mayormente en los meses de primavera-verano, a excepción de algunas de la 2ª y 3ª Fr de las muestras (Figs. 32, 33 y 34). Los mutagenos "frameshift" por el contrario, en general, se detectan a lo largo de todo el año, aunque los meses con mas muestras genotóxicas corresponden mayoritariamente a la primavera-verano. Esto indica probablemente que los genotóxicos que afectan a la TA 1535 y TA 100 se ven favorecidos por el aumento de la temperatura y escasez de

lluvia, entre otros posibles parámetros que los puedan afectar. Los genotóxicos que afectan a la TA 1538 se podrían encontrar permanentemente en el río, debido a descargas constantes de estos productos ó sus precursores; por otra parte podría ser que sus concentraciones aumentasen con la subida de las temperaturas, y de aquí el mayor número de muestras genotóxicas en los meses de primavera-verano. Los mutágenos que afectan a la TA 98, podrían provenir de vertidos ocasionales y puntuales (P1, P2 y P5) con alto contenido genotóxico.

El mayor número de respuestas con genotoxicidad positiva obtenida para los mutágenos "frameshift" pueden deberse, al mismo genotóxico o a que existan realmente más compuestos genotóxicos "frameshift" de origen natural o artificial, ya que éstos se pueden detectar con las cepas TA 1538 y TA 98, lo cual, en ocasiones pone de manifiesto la diferencia de sensibilidad que induce a las cepas la presencia o ausencia del Factor R. Así por ejemplo, la diferente respuesta genotóxica que se obtiene con cada una de las cepas (TA 1538 y TA 98) en algunas de las muestras del P2 (S, My/-S9 y J1, D/+S9) y P4 (S, My/-S9), puede sugerirnos que se trate de genotóxicos distintos. Sin embargo, las respuestas obtenidas con el resto de las muestras de estos puntos (P2, P4) arrojan valores de IM similares, elevándose en ocasiones conjuntamente para ambas cepas, resultando los valores correspondientes a la TA 1538 siempre mas altos, lo cual podría indicar que se trata del mismo genotóxico para el que la sensibilidad de la TA 1538 sería mayor (Fig. 28). Estos resultados nos ponen de manifiesto, de nuevo, que no siempre las cepas con Factor R son más sensibles a los mutágenos, que las cepas que carecen de él. Lo que sí parece evidente es que cuando el Factor R es afectado por el mutágeno, se favorece considerablemente en la mayoría de las veces la mutación inducida, aumentando el número de revertantes (los valores de IM más elevados, siempre se han detectado con la TA 98). También podría deberse al hecho de que el mutágeno esté más concentrado en estas muestras o se trate de un mutágeno de alta potencia. De acuerdo con nuestros resultados los trabajos de Maruoka y col. (1983), al realizar un estudio de mutagénesis potencial con agua de río clorada en el mismo laboratorio utilizando varios tipos de cepas, incluyendo entre ellas la TA 98 y TA 100, obtuvieron respuestas positivas

únicamente para la TA 1538,.

Resulta llamativa la diferencia de resultados de genotoxicidad positiva obtenidos con las cepas TA 1535 y TA 100 (Cuadro 6 y 9). Esto indica que entre las muestras ensayadas hay mutágenos que inducen la reversión bacteriana mediante sustituciones de pares de bases, pero por alguna razón no se afecta a la sensibilidad que proporciona el factor R, excepto en 2ªFr/P3/Ab/-S9/TA100 (Fig. 33). Con algunas muestras que son mutagénicas para la cepa TA 1535 (2ªFr/P1/Ab/-S9 y 3ªFr/P1/My/-S9) se observan ligeros aumentos de los IM para TA 100, pero en ningún caso se alcanza el umbral de genotoxicidad (Fig. 19 y 20). La escasa respuesta genotóxica que muestra la TA 100 a las muestras ensayadas, podría deberse a varias causas: 1) El criterio utilizado para considerar cuando un producto es genotóxico o no. Nosotros hemos aplicado la llamada "regla de las dos veces" para todas las cepas ensayadas (Maron y Ames, 1983), sin embargo, otros autores como Moriya, (1983), consideran respuesta positiva cuando el número de revertantes inducidos es 100 unidades mayor que la mutación espontánea (en cepas que poseen mutaciones espontáneas elevadas como la TA 100). El criterio empleado por nosotros podría resultar por tanto un requerimiento excesivo para determinar la genotoxicidad de la muestra por parte de la TA 100. 2) Podría ser que el río no contuviera en sus aguas, los genotóxicos que afectan a esta cepa o estuvieran en poca cantidad. 3) Que sí estuvieran los genotóxicos presentes en las aguas, pero no se hubieran concentrado o extraído adecuadamente mediante las técnicas fisico-químicas empleadas. Hay investigadores que señalan a la cepa TA 100 como la más sensible y adecuada para detectar genotoxicidad en concentrados orgánicos clorados (Bull y col. 1982; Forster y Wilson, 1981; y Jolley, 1987), y las aguas del río Tajo son naturales afectadas por emisiones de vertidos diversos, que en ocasiones sufren tratamientos primarios o secundarios, pero nunca desinfección por tanto no están cloradas. Esto supone una explicación al por qué no se detectan genotóxicos para la cepa TA 100.

La concentración y la extracción de las muestras son procesos críticos a la hora de detectar compuestos genotóxicos, ya que pueden obtenerse respuestas de

genotoxicidad diferentes con muestras de agua compleja, sometidas a tratamientos de concentración y extracción distintos (Maruoka y col. (1983 a yb) y Filipic, 1995).

El método de concentración elegido se basa en la utilización cartuchos C_{18} de Waters-Millipore, que retienen muestras polares (Mat. y Met. pág. 89). Este sistema es adecuado para concentrar muestras ambientales con alto contenido orgánico, siendo en numerosas ocasiones más eficaz que otras técnicas utilizadas, como se refleja en distintos estudios (Fontane 1981; Wolkoff y col. 1981; William y col. 1980; Moruoka y col. 1983 a y b; Monarca y cols. 1985). No ostante la concentración con cartuchos C^{18} es menos eficaz en la detección de orgánicos halogenados, que las resinas de absorción XAD (Monarca y cols. 1985) En la bibliografía existen muchos métodos de concentración, cada uno de los cuales son específicos para determinados compuestos, si bien muestran cierta afinidad por otros, lo cual indica que para alcanzar la máxima eficacia al concentrar, es importante tener cierto conocimiento *a priori* de los tipos de compuestos que se pueden encontrar según la actividad agrícola, industrial, etc. de la zona y la naturaleza del lecho del río.

Por otro lado, aunque los cartuchos C_{18} son ventajosos para absorber concentraciones elevadas de materia orgánica, con este sistema, se pueden perder algunos tipos de hidrocarburos no polares, pesticidas hidrófobos o compuestos inorgánicos, los cuales al poseer cierto grado de ionización (William y cols. 1980) necesitan para su concentración otros sistemas. En este sentido y para obtener un concentrado correcto de la totalidad de productos químicos que pueden existir en muestras con contenido diverso, y siempre que el tiempo no sea una condición indispensable, varios autores proponen métodos basados en la extracción con resina intercambiadoras de iones y posterior aplicación con técnicas cromatográficas basadas en la absorción de sustancias no iónicas (Epler y col. 1978; Dukta y col. 1981; Kool y Vankreyl, 1981; Wang y Lay, 1987; Urano y col. 1988b y Kromberg y Vartiainen, 1988).

En relación a los disolventes utilizados para la extracción o elución de los compuestos retenidos en la columna cromatográfica (mezcla de disolventes polares: agua/acetonitrilo 4:1; 1:4), es apropiada al cubrir un margen ancho de polaridad que permite absorber la mayor parte de los compuestos orgánicos disueltos en agua, los cuales constituyen el objeto de nuestro estudio: compuestos de bajo y medio peso molecular, no iónicos, en ocasiones con propiedades tensoactivas, solubles en agua en un intervalo amplio de pH, con grupos alquilo, metilo, etc. (Catalán, 1981; Urano y col. 1988abc).

Por otro lado, los disolventes elegidos han de ser solubles en agua y no tóxicos para las cepas de *Salmonella typhimurium*. El acetonitrilo cumple estas condiciones y tiene miscibilidad selectiva con compuestos orgánicos, facilitando la extracción de sustancias con cierta hidrofobia (International Programme on Chemical Safety, IPCS, 1993).

En estudios previos para extraer la materia orgánica del agua se han utilizado junto con el acetonitrilo otros disolventes como metanol, acetona, dimetilsulfosido (DMSO), etilacetato, etc., (Kinae y col. 1992; Ho and Quinn 1993; DuKta 1981). Todos ellos tienen polaridad moderada alta y potenciales redox estándar (E° = capacidad de un disolvente para eluir compuestos de una columna de alúmina Al_2O_3) situados entre 0,56 V para la acetona y 0,95 V para el metanol. El agua tiene un E° muy elevado, disolviéndose gran parte a la materia orgánica, de ahí su elección. Sin embargo, la extracción de la materia orgánica mediante un disolvente, no depende únicamente del índice de polaridad o del potencial redox estándar que tenga éste, sino que influyen factores tales como las posibles interacciones que se puedan establecer entre los grupos funcionales del disolvente y del sustrato, la velocidad de paso del disolvente o la combinación de algunos de los factores arriba mencionados (Ho y Quinn 1993).

Por otro lado, en la bibliografía consultada, hemos observado que cuando se trata de extraer compuestos orgánicos halogenados, ya sean aguas de bebida,

pesticidas organoclorados o hidrocarburos de alto peso molecular con polaridad moderada, se utilizan disolventes con índices de polaridad inferiores a los indicados arriba, como cloroformo, mezclas de disolventes acetona/hexano 15:85, (Earle y cols. 1981), o éter de petróleo (Kilikidis y cols. 1992), etc. Esto indica que, si bien gran parte de la materia orgánica se extrae con disolventes de polaridad moderada o alta, existe otro grupo de sustancias, indicadas arriba, que se eluyen con disolventes de baja polaridad. En nuestro caso, probablemente estas últimas no aparecerán en nuestros extractos y entre ellas las organo-halogenadas (que provocan la reversión de la cepa TA 100) por lo que ha sido poco eficaz en nuestros ensayos (Kronberg y vartiainen, 1988; Monarca y col. 1985).

Al eluir los cartuchos C_{18} cargados con las muestras con distintas mezclas de los disolventes en diferente proporción, se fraccionan las muestras obteniéndose 3 extractos: 1ª Fr, 2ª Fr y 3ª Fr. El carácter genotóxico se detecta en muestras de agua de todos los puntos de muestreo, preferentemente en las 1ª Frs. (42,39 %), y 2ª Frs. (34,78 %) de las muestras. En las 3ª Frs. (extractos formado por adición de las 1ª y 2ª Fr, a partes iguales), se detecta menor carácter genotóxico (16,30 %) (Fig. 30 y 34). Resultan tóxicas, las 2ª Fr de la casi totalidad de las muestras.

En cuanto a los puntos de muestreo, en P1 y P3 (Cuadros 1 y 3), se extrajeron el mayor número de productos genotóxicos en las 2ª Fr de las muestras (compuestos solubles en disolventes moderadamente polares a pH ligeramente ácido). Por el contrario en P2, P4 y P5 (Cuadros 2, 4 y 5) los productos genotóxicos de las muestras muestran mayor afinidad por el disolvente utilizado para obtener la 1ª Fr de éstas (compuestos solubles o ligeramente miscibles en agua a pH aproximadamente neutro). De esta forma, con la 1ª Fr se extraen preferentemente mutágenos del tipo "frameshift", pues son las cepas TA 1538 y TA 98 las mas afectados por los genotóxicos de ésta fracción de la muestra (Fig. 32). Sin embargo, en la 2ª Fr de la muestras se extraen productos genotóxicos que provocan ambos tipos de mutaciones básicas: sustitución de pares de bases (cepas TA 1535 y TA 100), y "frameshift" (cepa TA 1538 y TA 98) (Fig. 33). Esto indica mayor especificidad por parte de los

mutágenos que inducen la reversión en las cepas TA 1535 y TA 100. El extracto reconstituido (3ª Fr) induce mayor número de mutaciones en la cepa TA 1535, que en las TA 1538 y TA 98 conjuntamente (10:6) (Fig. 34).

Las fracciones químicas más estables poseen componentes menos reactivos (Ho y Quinn, 1993). Estas son las que se extraen con disolventes no polares, mientras que las más activas químicamente (grupos mas reactivos: cetonas, quinonas, carboxilos, etc) son menos estables, y más afines por el agua y los disolventes polares. De acuerdo con este principio, para nuestras muestras, los genotóxicos que son extraídos con la 2ª Fr serían más estables que los de la 1ª Fr, pudiendo en ocasiones alcanzarse concentraciones elevadas y resultar tóxicos.

Cuando analizamos la estabilidad de la 1ª y 2ª Fr de las muestras observando los resultados del Ensayo 1 y Ensayo 2 (después de estar almacenadas), no se observa que los de la 2ª fracción sean más estables, pues la relación de muestras ensayadas que conservan el mismo carácter de genotoxicidad después de realizar el Ensayo 2 (4 semanas) es muy similar con la 1ª y 2ª Fr. Hay que mencionar, que aunque nuestra 2ª Fr (agua/acetonitrilo 1:4) es más apolar que la 1ª Fr (agua/acetonitrilo, 4:1) se considera como "moderadamente polar", lo que indica que hay todavía una serie de compuestos más apolares y estables, los cuales probablemente nosotros no hayamos detectado. Esto puede en parte, también justificar la existencia de un mayor número de mutágenos "frameshift" que mutágenos que provocan sustituciones en pares de bases.

Por otra parte algunos autores utilizando técnicas de concentración con resinas XAD (Moruoka y col. 1983a) han descrito un incremento de actividad mutagénica en los extractos neutros, respecto de los ácidos o básicos, y Filipic, (1995), utilizando la misma técnica de concentración (XAD) indica que en el extracto ácido se concentra la mayor parte de las sustancias tóxicas. Nuestros resultados no discrepan de los obtenidos por estos autores, pues de los 13 extractos en los que se detectan sustancias tóxicas, 12 de ellos corresponden a la 2ª Fr (Ph=4) y 1 a la 1ª Fr (Ph=7). Factores

tales como el aumento de la temperatura, la escasez de lluvias, el aumento de los sólidos en suspensión y la conductancia elevada, son decisivos en la formación de sustancias tóxicas, y estos parámetros se mantienen elevados en todas las muestras de agua en las que se ha detectado toxicidad (Tabla 1).

Por otro lado, la disolución de acetonitrilo es de pH 4, y previamente a su eliminación podría haber reaccionado con algún componente de la muestra, aumentando la presencia de compuestos tóxicos, ya que a mayor acidez se favorecen los procesos de disociación y se aumenta la reactividad.

En general, los resultados obtenidos con los tres extractos de las muestras (1^a, 2^a y 3^aFr) nos muestran una diferencia entre el carácter genotóxico de la 1^a y 2^a Fr, existiendo en determinadas muestras, sinérgismo (ejemplo: P1/My/-S9/TA 1535 y P1/S/+S9/TA 1538), antagonismo (ejemplo: P1/F/-S9/TA 98 y P4/Jn/-S9/TA 1535) y potenciación (ejemplo: P4/E/-S9/TA1535 y P2/Jn/+S9/TA1535), como lo prueban los resultados de la 3^aFr (Figs. 23-27). Las muestras con carácter antagónico predominan sobre las que poseen sinérgismo en una relación (50:13). Este comportamiento fue similar en la mayoría de los casos, cuando los ensayos se realizaron sin y con tratamiento metabólico S9. Estos resultados lo que prueba que de no haber realizado el fraccionamiento, probablemente no hubiéramos detectado una serie de compuestos que se inhiben en presencia de otros, pero que al variar las condiciones (factores físico-químicos) pueden no interraccionar. Los efectos biológicos de muestras complejas son a menudo impredecibles, y al separar sus compuestos en fracciones distintas, se facilita su caracterización química y la previsión de su comportamiento, en función de la estabilidad química de los componentes que los integran (Ho y Quinn, 1993). Al minimizar las reacciones antagónico/sinérgicas, se pueden desenmascarar potencialidades genotóxicas que en la muestra completa pueden no apreciarse. (Stahl, 1991; Ma y cols. 1992).

Cuando los ensayos de genotoxicidad se realizaron después de tratar las muestras con el extracto metabólico S9, el número de muestras con genotoxicidad que

mostraron genotoxicidad positiva o inicios de ella, fue realmente inferior al obtenido en su ausencia, (62, -S9 y 24, +S9), lo que indica que en las aguas del río Tajo predominaban los genotóxicos detoxificables por mamíferos. Sin embargo, también existen en el río sustancias pregenotóxicas que se convierten en genotóxica, al sufrir los procesos de biotransformación metabólica. Los mecanismos de biotransformación de sustratos extraños al organismo, en general los detoxifican, pero en algunas ocasiones provocan o aumentan la toxicidad (CHung, 1983; Loomis, 1982 y Naudín y cols. 1995), Lo cual, los resultados obtenidos justifica.

Nuestros resultados coinciden con los de numeros trabajos en los cuales, en general, hay descenso de la actividad genotóxica cuando someten las muestras a la activación metabólica +S9, sufriendo con ello un proceso de detoxicación, propio de los mamíferos (Lemos y col. 1994). Por otro lado, Stahl, 1991, indican que la mayoría de los genotóxicos existentes en agua, con contaminantes de origen industrial, son de una naturaleza tal, (y nuestra experiencia nos dice que fundamentalmente los genotóxicos "framenshift"), que no requieren de la actividad metabólica "mutagenos de acción directa", siendo además, altamente inestables, sensibles a los tratamientos alcalinos y dependientes a la hora de aumentar o decrecer su actividad genotóxica del proceso de cloración empleado. En ésta última situación se encontrarían principalmente los que provocan sustituciones de pares de bases.

A pesar de la información recogida , se ha de tener consciencia de que la valoración de los resultados se ha de considerar con suma prudencia, ya que la información es limitada, aproximándonos con ellos únicamente a la realidad del problema, ya que en ocasiones podrían generarse falsos positivos ó negativos, debido a la multitud de factores que pueden influir en las respuestas. Existen datos que indican que la propia fracción S9 puede ser la causa de la aparición de falsos positivos y negativos. La valoración de falsos positivos ó negativos, se realiza en función de los resultados obtenidos en ensayos de carcinogenicidad en animales (Tezuka y col. 1980 y Heddle 1988), lo cual, también puede ser en si mismo ser motivo de valoraciones equívocas (Taylor 1982). Heddle, (1988) tras estimar los resultados obtenidos con 4

tipos distintos de ensayos de mutagénesis "in vitro" de corta duración, llegó a la conclusión de que el Test de Ames es el que produce el índice más bajo de falsos positivos.

Entre los productos químicos cuya genotoxicidad se ve favorecida mayoritariamente al someterlos a la fracción S9, parecen encontrarse muchos de los precursores naturales de mutágenos existentes en las aguas cloradas, como los trialomentanos (Maruoka y col. 1983 a y b).

Se detectan 13 casos de toxicidad al ensayar las muestras de la 1ªFr, 2ªFr y 3ªFr: 9 fueron sin tratamiento de activación metabólica S9 y, 4 cuando si se sometieron al tratamiento. Se observó que las primeras (-S9) en una mayoría de los casos se transforman en no mutagénicas (38,46%), produciéndose por tanto un proceso detoxificante (2ªFr/P1/Ag/+S9/TA1538, 2ªFr/P3/Ag/+S9/TA1538 y 2ªFr/P5/Ag/+S9/TA1538 y 1ªFr/P4/Jn/+S9/TA1535 y 2ªFr/P4/Jn/+S9/TA1535). En otros casos la naturaleza del tóxico o la concentración en la que se encontraba era tal, que el proceso de detoxificador no fue capaz de actuar (2ªFr/P1/Ag/+S9/TA1535, 2ªFr/P2/Ag/+S9/TA1535 y 2ªFr/P3/Ag/+S9/TA1535); y solo en uno de ellas, se transformó el carácter tóxico en un potente genotóxico (2ªFr/P1/Jn/+S9/TA1535). Por tanto las muestras tóxicas para la cepa TA 1538 se detoxificaron cuando se las trató con la S9, lo que sugiere que los genotóxicos "frameshift" detectados por la TA 1538, son mas inestables y reactivos.

El proceso biotransformante, por efecto de la S9 de productos tóxicos a genotóxicos indicado en la 2ª opción, lo detecta también Caballo 1991, al realizar un estudio en piretroides que poseen un grupo "ciano". Con este mecanismo de biotransformación se pone de manifiesto varias consideraciones:

- (1) La mayoría de los genotóxicos son también tóxicos en alguna medida, lo cual, en ocasiones, cuando se trata de genotóxicos débiles puede enmascararse la genotoxicidad del producto. Esto se comprueba con las curvas dosis-respuesta

para la mayoría de los genotóxicos (Maron y Ames, 1983), las cuales se mantienen lineales hasta una determinada concentración en que empiezan a decrecer, debido a la muerte celular. Esto, sin embargo, no parece ser el caso de la 2ª Fr de la muestra P1/Jn/cepa TA 1535, la cual fue tóxica en ausencia de la S9 y por el contrario, fue genotóxica para las 3 fracciones extraídas en presencia de la S9. Lo que nos indica que la responsabilidad del efecto mutagénico podría haber recaído en un metabolito del tóxico, tras someter éste a su biotransformación catalizada por las enzimas degradativas de la fracción microsomal S9.

- (2) El efecto genotóxico obtenido para las 3 Fracciones de la muestra 1ª, 2ª y 3ª Fr/ +S9/P1/Jn, parece ser independiente de la concentración del producto, al contrario, no sucede lo mismo con el efecto tóxico. En esta muestra el tóxico se extrae preferentemente con la 2ª Fr, por cuyo disolvente parece mostrar gran afinidad concentrándose y poniendo en evidencia su toxicidad. En las otras fracciones, por el contrario, se encuentra un promutágeno, el cual independientemente de la concentración, se transforma en genotóxico en presencia de la +S9.
- (3) En el 3º tipo de biotransformación pudo suceder que hubiera cierto antagonismo entre el compuesto y el sistema enzimático de la fracción S9. Esto parece ser que sucede con determinados hidrocarburos aromáticos policíclicos, en los cuales parece ser que la forma activa que interacciona con el DNA es un epóxido. La presencia en la S9 de enzimas epóxido hidrasas catalizaría en primer lugar la reacción de los grupos epóxidos a hidroles, los cuales no reaccionan con el DNA (Herrera, 1987). Este tampoco parece ser nuestro caso, pues los tóxicos han sido detectados con la cepa TA 1535 y no con la TA 1538, lo cual es la mas apropiada para detectar los compuestos aromáticos; aunque podría tratarse de un proceso similar.

Existe un 4º proceso de biotransformación metabólica detectado, el cual se origina cuando la sustancia química original se transforma en otra más tóxica. En este caso, la muestra original, en ausencia de S9 no es tóxica (2ªFr/P5/TA 1535), y al someterla a su acción, se transforma en tóxica. Lo más probable es que se trate de un promutágeno presente en el agua, los cuales ya hemos comentado que existen en las aguas del Tajo; pero existe también, aunque remota otra posibilidad: hay datos sustanciales que hacen pensar que el acetonitrilo tiene efectos tóxicos sistémicos a través de su transformación metabólica en cianuro, lo cual resulta catalizado por el sistema de la citocromo-P-450-monooxigenasa (IPCS-International Programme on Chemical Safety, 1993). Este sistema enzimático es uno de los que integran la dotación enzimática de la S9, encargándose del transporte y conversión del O₂ molecular en oxígeno activo y oxidar en último término, al sustrato. Para la extracción de los materiales retenidos en la columna cromatográfica, nosotros utilizamos el acetonitrilo, el cual, como se indica en Materiales y Métodos, se elimina posteriormente mediante rotavapor, y se liofiliza la muestra hasta la obtención de un residuo seco. Sin embargo, existe la posibilidad que la totalidad de acetonitrilo no fuera extraído, pudiendo permanecer residuos en la pared del recipiente o asociado al residuo seco, en tal caso, significaría que la S9 podría haber reaccionado con el acetonitrilo presente, obteniéndose por tanto cianuro, el cual es altamente tóxico.

Una vez comentado, algunas de las variables de las que se dispuso para realizar el estudio de genotoxicidad en el tramo del río estudiado, indicando el comportamiento que presentaron frente a las distintas muestras ensayadas, haremos un análisis de cada uno de los puntos de muestreo. En ellos se señalan las características propias de cada uno, en base a lo descrito en las variables estudiadas, procesos que han podido intervenir en el desarrollo genotóxico de las aguas, épocas o meses estacionales mas conflictivos en los cuales se ha podido incrementar la genotoxicidad, algunos de los parámetros fisico-químicos analizados. Por último, comentaremos la influencia que han podido tener los diferentes vertidos emitidos al agua en los distintos puntos muestreados, sobre su genotoxicidad ó los procesos naturales propios que pueden acontecer en las aguas de los rios como escorrentias, lluvias, cambios climáticos,

vegetación, etc.

El P1 y P2, ya hemos comentado que fueron los 2 puntos mas contaminados y con un mayor poder genotóxico del área de estudio, pues practicamente se detecta en ambos, el mismo número de muestras con componentes genotóxicos 23 (P1) y 22 (P2). Sin embargo vistos los resultados P1 contenía genotóxicos mas potentes y mayor número de muestras tóxicas, lo cual resulta lógico dada su proximidad a la zona mas industrializada de Aranjuez y Toledo.

Por otro lado, P1 y P2 mantuvieron ligeras tendencias inversas en relación a la fracción con la que se extrajo mayor número de agentes genotóxicos, así como la cepa que resultó mas sensible a los genotóxicos de cada punto. En P1 (Cuadro 1) predominaban los productos genotóxicos extraídos con la 2ª Fr, y la cepa que resultó mas afectada en su sensibilidad por las muestras ensayadas fue la TA 1535 (Cuadro 6). Con la 1ª Fr de la muestra predominaron los mutágenos "framenshift" (inducen la reversión de las cepas TA 1538 y TA 98), a excepción de la muestra de Ab/TA1535, la que comentaremos más adelante. Siguiendo con P1, en el extracto 2ªFr, las muestras que se extrajeron en verano (Jn y Ag) fueron tóxicas para TA 1535 y TA 1538, sin embargo estas fueron las que indujeron a la TA 1535, mas numerosas, potentes y estables. Pues cuando se sometieron estas muestras a la digestión metabólica S9, se mantuvo la genotoxicidad, transformándose la toxicidad de Jn en un potente mutágeno (Fig. 33). Con esta 2ªFr, también se extrajeron genotóxicos en F/TA98 y TA1538 y Ab/TA1535, TA1538 y TA98 y por último My/1538; sin embargo estas muestras a excepción de la de My parecen tener un significado diferente:

La genotoxicidad de las muestras de F y Ab parece haberse debido a descargas ocasionales de vertidos con componentes diferentes, pues aunque la TA 98 se sensibilizó con el primer extracto de ambas muestras, las cepas que resultaron afectadas fueron distintas con el 2º extracto de las dos muestras. La muestra de F, pareció ser menos compleja, detectandose genotoxicidad para TA 98/-S9 para ambas

fracciones, 1ªFr (5,56) y 2ªFr (4,49) (Figs. 32 y 33). Ambas fracciones probablemente contendrían agentes genotóxicos del tipo "frameshift" (muchos de los cuales son compuestos aromático-derivado/s), siendo además potentes genotóxicos, o podrían haberse encontrado en elevadas concentraciones, conocido el valor alcanzado de IM. Como hemos indicado antes los genotóxicos "frameshift" parece que son menos específicos respecto a la fracción de la que se extraen, que los genotóxicos que provocan sustituciones de pares de bases. La genotoxicidad de F/TA 1538/1ªFr/-S9 (Fig. 32), también podría tratarse del mismo genotóxico que induce a la TA 98, pues como hemos indicado, ambas cepas bacterianas poseen la misma mutación básica, cumpliéndose en esta muestra a diferencia de una mayoría en la que no se cumple, la teoría de que la presencia del factor R aumenta la sensibilidad de las cepas que lo poseen.

En cuanto a la muestra de Ab resultó ser mas compleja, pues habia agentes genotóxicos en la 1ª, 2ª y 3ª Fr, provocando la sensibilidad de todas la cepas, excepto la TA 100 (Fig. 32, 33 y 34). Aunque fue el extracto de la 1ª Fr para la TA 1535, seguido de la TA 98, donde se alcanzaron los IM mas elevados (Tabla básica 1). El contenido genotóxico en esta muestra podría deberse a 1, 2, ó mas agentes genotóxicos distintos. Que se trate del mismo genotóxico es factible, por el hecho de que son ensayos independientes y existe bibliografía de la existencia de numerosos compuestos que contienen conjuntamente en su estructura molecular, grupos capaces de inducir ambos tipos de mutaciones: "frameshift" y "sustituciones de pares de bases". Entre estos grupos podemos citar las aminas aromáticas y sus derivados o los numerosos hidrocarburos existentes con una o varias sustituciones en sus grupos aromáticos, metilantes, alquilantes, etc. (Chung y Cerniglia, 1992). Actuaría un grupo químico u otro en función de la cepa utilizada (grupo aromático, para las cepas TA 1538 y TA 98; y grupo alquilante, metilante etc. para la cepa TA 1535). Además, hay trabajos con sustancias químicas que inducen procesos de reversión bacteriana en varias cepas con mutaciones básicas distintas (Meier y cols. 1983; Filipic, 1995). Si en la muestra de Ab hubieran existido 2 genotóxicos distintos, el que sensibilizó a la TA 98 hubiera actuado probablemente de forma similar al genotóxico de F/TA 98

comentado anteriormente. Sin embargo el que afectó a la TA 1535, presentaría propiedades diferentes a la mayoría de los otros genotóxicos que indujeron a las cepas TA 1535 y TA 100, (los cuales se extrajeron con la 2ª Fr de la muestra), ser solubles en agua, lo que les permitió su elución inicial en la 1ª Fr. Posteriormente al saturarse la 1ª Fr, el resto del genotóxico se extrajo con la 2ª Fr. Por último si hubieran sido mas de 2 agentes genotóxicos los contenidos en la muestra de Ab, se hubiera producido el fraccionamiento de la muestra, siendo unos genotóxicos mas solubles en agua (1ªFr) y otros moderadamente polares en disolventes orgánicos (2ªFr). El número de genotóxicos que componen la muestra de Ab, unicamente podríamos saberlo, si hubieramos identificado las sustancias que integran la muestra con técnicas adecuadas como HPLC-MS, lo cual, en principio no formaba parte de los objetivos del estudio.

En P2 (Cuadro 2) como indicamos, se mantuvo la tendencia inversa a P1 cuando con la 1ªFr de la muestra, se obtuvo el mayor número de respuestas genotóxicas positivas (Fig. 28 y 32), y fue la cepa TA 1538 que resultó mas sensible cuando los ensayos se realizaron sin tratamiento metabólico S9, manifestándose en contra del aumento de sensibilidad que provoca el Factor R, a diferencia del P1 que fue la cepa TA 98 la mas sensible a los agentes genotóxicos. Cuando el extracto de la 1ªFr/P2 se puso en contacto con +S9, disminuyó el efecto mutagénico para la TA 1538, aunque siguió siendo mutagénico. Sin embargo aumentaron en general los IM para la TA 98 rozando el umbral de mutagenicidad en las muestras de otoño e invierno (Fig. 32). En la 2ªFr/P2 (Fig. 33) se detectaron menos muestras genotóxicas que en la misma fracción del P1, pero se indujeron las mismas cepas TA 1535 y TA 98, lo cual indica que tenían productos genotóxicos con características similares, siendo mas abundantes en P1. En relación a la época del año en que se detectó genotoxicidad, fue para la cepa TA 1535, preferentemente el verano, con algunos casos aislados en otoño e invierno, y en cuanto a la TA 1538 y TA 98, la genotoxicidad se detectó a lo largo de todo el año, aunque los IM mas elevados fueron los que correspondian a los meses de verano o próximos a él (Fig. 18,19 y 20). Estos últimos valores elevados de IM, podrían ser la consecuencia de descargas de vertidos ocasionales con componentes

altamente genotóxicos (-S9/TA1538/J1 y -S9/TA98/S).

En el extracto reconstituido (3^aFr/P1) (Fig. 23, 30 y 34), el número de muestras genotóxicas disminuyó considerablemente, por lo cual hubo probable antagonismo entre algunas sustancias del 1^o y 2^o extracto. Parece que podían existir dos muestras (TA 1535/+S9/Jn y TA 1535/-S9/My), donde el antagonismo fue parcial, pues los IM que correspondieron a la 3^a Fr, siguieron siendo mutagénicos, aunque inferiores a los IM de los correspondientes extractos que dan a las muestras la genotoxicidad: +S9/2^aFr/Jn (3,9)" y -S9/1^aFr/Ab (3,28). La existencia de posible antagonismo total ó parcial entre las fracciones de la muestra total es indicativo de la necesidad de proceder a un análisis por fracciones de cada una de las muestras, lo que permite detectar la presencia de compuestos genotóxicos.

Sin embargo en el P1 y P2 también se produjo sinergismo entre los distintos extractos de las muestras, siendo mas abundantes los originados en el P2 (Fig. 23 y 24), para las cepas TA 1535 y TA 98, algunos de los cuales se detectaron cuando la muestra no presentaba tratamiento S9 y otros cuando si lo presentaban. En el P1 las muestras en que se apreció sinergismo se obtuvieron para TA 1535 y TA 1538, siendo mayor el número de casos en esta última, observándose que la muestra de diciembre (D) fue sinérgica en -S9 y antagónica en su presencia (Fig. 23).

El contenido en promutágenos (sustancias que necesitan de activación metabólica para activarse genotóxicamente) en el P1 fue escaso (Fig. 23), unicamente se detectó en 1^a, 2^a y 3^aFr/Jn y 3^a Fr/S, siendo este último un caso de sinérgismo en presencia de +S9. La genotoxicidad de los tres extractos del mes de Jn/+S9, ya fue comentada al referirnos a los mecanismos de biotransformación metabólica detectados, cuando se sometieron las muestras tóxicas a la acción de la +S9. Cuando los distintos extractos del P2, se sometieron a la activación metabólica S9 (Fig.24), ya comentamos que disminuía la actividad genotoxica para TA 1538 y aumentaba para la TA 98.

En el punto 3 se detectaron muestras genotóxicas en todos los meses de verano y algunos meses aislados de otoño y primavera (Fig. 25). El carácter genotóxico se obtuvo siempre con la 1ª y 2ª F. de las muestras. La genotoxicidad en la 1ª Fr se detectó con la TA 1538 y sin activación metabólica (- S9) excepto en el mes de septiembre que apareció al tratar la muestra con +S9. Aunque en algunos meses los IM de las muestras ensayadas con la TA 1538, no superaban el umbral de mutagenicidad ≥ 2 , si se situaban próximo a él (1,92/O), considerándose tales muestras como mutagénicas. En otros meses por el contrario unicamente se mostraba un ligero incremento de los valores, lo cual nos indicaba que había mutágenos "frameshift", pero no estaban a la concentración suficiente como para inducir al número de revertantes necesarios para considerar la muestra genotóxica (1,57/Ag, 1,53/N, 1,63/E y 1,76/Mz). En general los IM que no alcanzaban el umbral de genotoxicidad eran los de los meses de otoño e invierno, volviendo estos a incrementarse en la primavera (Fig. 28), lo cual podía haber estado influenciado por el aumento de la temperatura del agua que incrementaría las posibles reacciones de los mutágenos en potencia, así como por el aumento de las precipitaciones a partir del mes de septiembre, que podrían haber diluido la muestra (Figs. 17 y 18).

La 2ª F. de las muestras del P3 en los meses de primavera y verano contenían mutágenos que afectaban preferentemente a las cepas TA 1535 y TA 100, es decir, provocaban el mismo tipo de mutación básica en el gen G-46 (sustitución de pares de bases). Sin embargo, parece que habría, al menos de 2 tipos mutágenos diferentes: uno/s estarían afectando a la cepa TA 1535 en el verano; Jn y Ag, resultando esta última muestra del mes de Ag tóxica (-/+ S9), probablemente por la cantidad de genotóxico que se haya acumulado debido a las altas temperaturas y a la poca movilidad de las aguas y otro segundo genotóxico que afectaría a la sensibilidad del factor R, existente en las cepas TA 100. Esta última muestra fue la única muestra que provocó la reversión para la cepa TA 100 en todo el estudio, siendo un mutágeno débil (IM=2), pero que mantuvo una estabilidad mínima de 4 semanas, pues este fue el tiempo que transcurrió entre la realización del ensayo 1 y el 2, obteniendo en este último ensayo también resultados positivos para esa muestra (Tabla básica 3).

No apareció ningún caso de genotoxicidad en la 3ª Fr de las muestras en el P3, lo cual indicaba la existencia de cierto antagonismo entre los genotóxicos de la 1ª y 2ª Fr de cada una de las muestras de cada mes, corroborándose de nuevo la necesidad de fraccionar la muestra total, como sucedía en algunas muestras de P1.

Punto 4: (Cuadro 4), resultó ser a continuación de P1 y P2 el tercer punto de muestreo mas contaminado. En cuanto al tipo de genotóxicos detectados en las muestras del P4 y la estación del año en que aparecieron, se observó que, (siempre sin tratamiento con S9) eran los extractos de la 1ª Fr de la muestra, los que poseían claro carácter genotóxico para la cepa TA 1538 en el otoño, y algunos meses de la primavera y de verano; comportamiento similar a la mayoría de estas muestras poseía la TA 98, aunque sin alcanzar el umbral de mutagenicidad, además se detectó carácter tóxico en Jn/TA 1535 y presencia de promutágenos en N/TA 1538 y TA 98 (Fig. 28 y 32). Con la 2ª Fr, se apreció genotoxicidad, si bien en menor cuantía, para todas las cepas utilizadas excepto para la TA 100, resultando sensiblemente mas afectada la TA 1535 (Fig. 29 y 33). Con el extracto reconstituido (3ª Fr) se produjo un claro sinergismo, detectándose genotoxicidad para TA 1535/S y E y en presencia de S9/TA 98/D (Fig. 26 y 30).

Según las cepas mutantes con las que se detectó genotoxicidad, algunos de los valores de índices de calidad de agua obtenidos: alta concentración de fosfatos y poco oxígeno disuelto (Tabla 1), así como la no emisión de vertidos industriales, nos sugiere, que al menos en P4 había dos tipos de genotóxicos con orígenes naturales: los "frameshift", los cuales fueran compuestos aromáticos solubles en agua, detectándose preferentemente con las cepas TA 1538 y TA 98 y además mantuvieran probablemente relación con procesos en los que intervengan complejos inorgánicos; y los genotóxicos que provan sustituciones de pares de bases (TA 1535), los cuales, podían haberse generado como consecuencia de los problemas de eutrofización. Los genotóxicos "frameshift" para la TA 1538 que se detectaron en la 1ª Fr, resultaron antagónicos al ponerlos en contacto con el extracto de la 2ª Fr en ausencia de activación metabólica S9. Por el contrario, se produjo sinergismo para la cepa TA

1535 (-S9) y para la TA 98 (+S9), con algunos compuestos de la 1ª y 2ª Fr como comentamos al referirnos al extracto reconstituido 3ª Fr (Tabla básica 4, Fig. 26). Por otro lado algunos de los genotóxicos detectados en el P4 parece que eran bastante estables (cepa TA 1535/-S9/3ªFr/S; TA 1538/-S9/1ª,2ª y 3ªFr/Ab y por último TA 98/-S9/2ªFr/My) pues al realizar el Ensayo 2, los IM mantuvieron valores similares a los obtenidos en el Ensayo 1. Todo ello conduce a la idea de que la genotoxicidad detectada en las muestras del P4 pueden deberse a procesos naturales originados en gran parte por las características propias que presentan los embalses: "la eutrofización de origen natural". El problema que genera la presencia de compuestos genotóxicos se agudiza en los meses estivales debido a las subidas de las temperaturas, la escasez de lluvia, el aumento de compuestos tanto orgánicos, (procedentes de la descomposición de la materia viva), como inorgánicos (procedente del arrastre del terreno). A ésto se suma la riqueza en sales minerales de esta zona, y todo ello provoca la escasez de oxígeno disuelto en las aguas (con el mínimo en agosto, 3,8 mg/l, por debajo de los límites requeridos para la vida piscícola). Además, al estar el P4 a la salida de un embalse, por tanto con poca aireación y poca regeneración del oxígeno, se dificulta el proceso de autodepuración de las aguas.

Se sabe que la eutrofización de los embalses puede generar diversos problemas aparte del de la disminución del O₂ disuelto en el agua, como la posibilidad de generar determinados compuestos mutagénicos, debido en ocasiones a la presencia de determinadas sustancias premutagénicas. Por ejemplo, hay trabajos que vinculan claramente la eutrofización de los embalses (Palmstrom y cols. 1989) a la formación de los precursores de los trihalometanos (THN), materia orgánica presente en la superficie del agua, de origen en parte natural: ácidos húmicos y fúlvicos (Meier y col. 1983); los cuales son potentes cancerígenos cuando se someten a los procesos de cloración (Tikkanen y Kronberg, 1990; Maruoka y col. 1983ab).

Por otro lado está el problema añadido de las toxinas acuáticas producidas cuando hay un crecimiento excesivo de algas, muchas de las cuales, se está comprobando, que son precursoras de sustancias altamente tóxicas y mutagénicas

(Gengfu y col. 1995). Todo este cúmulo de sustancias complejas y de condiciones ambientales extremas que concurren en los embalses, harían posible en las aguas del P4 y posiblemente también en P3 (embalse de Azután), la presencia de sustancias mutagénicas en abundancia. Además se puede añadir la circunstancia de que la luz solar puede ser causa de formación de sustancias mutagénicas en el ambiente acuático cuando hay en él presencia de iones nitrato ó nitrito lo que posibilita la sucesión de procesos de nitrificación por la fotólisis de dichos iones (Suzuki y col. 1990).

En el punto 5 (Cuadro 5), la actividad genotóxica, se distribuyó de forma similar, a los puntos anteriores, es decir, en el verano se produjo la mayor actividad genotóxica, en primavera los valores se incrementaron, alcanzándose en determinadas muestras niveles de genotoxicidad y en otoño e invierno se obtuvieron casos aislados de genotoxicidad. Con los datos disponibles podemos pensar que los vertidos emitidos al río Alberche contenían componentes que se extrajeron con la 1ª y 2ª Fr, con potencial genotóxico directo (-S9) sobre las cepas TA 1538 y TA 98, e indirectos, es decir, promutágenos que necesitan para activarse de la +S9 sobre la TA 1535 y TA 98 (Fig. 27 y 31). La extracción del genotóxico detectado en JI/TA1538 se produjo con la 1ª Fr de la muestra, lo que nos indica que era soluble en el agua. En el resto de los meses (excepto Fe, del cual trataremos más adelante), donde los IM se elevan sin alcanzar el umbral genotóxico para la misma cepa, se podría considerar al mismo genotóxico responsable de la elevación (1,84/O, 1,63/E, 1,54/Ab y 1,65/ My). Sin embargo, al no darse las condiciones favorables (aumento de la temperatura, escasez de lluvia, etc.), el genotóxico no se concentró lo suficiente para inducir un mayor número de revertantes. Las cepas TA 1538 y TA 98 mostraron comportamientos similares en la mayoría de los meses del año, resultando ligeramente más elevado los IM correspondientes a la TA 1538; lo que nos hace pensar que hay mayor sensibilidad de la TA 1538 hacia los productos extraídos con la 1ª Fr de muestra (mutágenos "frameshift" solubles en agua). La mayor sensibilidad de la cepa TA 1538 hacia los productos de la 1ª Fr de la muestra es un comportamiento generalizado para todos los puntos de muestreo analizados, lo cual no es lo que en un principio cabe esperar, pues en principio son las cepas que poseen el factor R en el genoma (TA98 en este caso)

las que muestran una mayor sensibilidad a los posibles mutágenos.

La toxicidad detectada para la TA 1538/2ªFr/-S9/Ag (Fig. 21), podría haber sido debida al mismo genotóxico que se detectó para la misma cepa TA1538/1ªFr/JI/-S9, que estaría más concentrado debido a nuevas descargas del vertido, ó por el contrario, podría haberse tratado de un producto diferente más hidrofóbico y por tanto más afín al disolvente empleado para extraer productos en la 2ª Fr. En este caso, el fraccionamiento de la muestra resultaría eficaz, pues separaría productos tóxicos (2ª F.) de genotóxicos (1ª F.).

Si la toxicidad de Ag hubiera sido inducida por el mismo genotóxico que ocasiona la de JI, como hemos indicado antes, su presencia en el extracto de la 2ªFr podría estar en parte justificada, ya que la turbidez en este mes estaba aumentada (Tabla 1) pudiendo haber habido asociación entre el genotóxico y la materia en suspensión del medio. En este caso, el genotóxico resultaría menos soluble en agua y por tanto, su elución más favorable a un disolvente moderadamente polar como es el acetonitrilo, utilizado para obtener el 2º extracto de las muestras. Además, parece ser que la toxicidad de las muestras se detecta primordialmente en las fracciones ácidas (Filipic, 1995), lo que puede ser debido al propio producto, al extraerse más fácilmente en ésta fracción. Por otro lado, este genotóxico parece ser moderadamente persistente, pues al realizar el Ensayo 2 con el mismo extracto de la muestra (1ªFr/JI/TA 1538/-S9), el resultado siguió siendo genotóxico;

Por otro lado, hay trabajos de muestras con carácter ácido (Maruoka y cols. 1983ab) con aguas de río, cloradas en el laboratorio que indican, que la cloración del agua aumenta la actividad mutágena de las muestras, lo que les sugiere a estos autores que la cloración del agua podría producir sustancias nuevas y/o incrementar la actividad mutagénica de los mutágenos pre-existentes en el río.

En relación al carácter genotóxico que se detectó en la muestra de Fe (Fig. 31), éste se apreció con la misma intensidad en todas las fracciones de la muestra; siendo

la cepa TA 98, sensible a la 1ª y 2ª Fr de la muestra y la TA 1538 sensible a la 3ª Fr (fracción reconstituida). Por tanto, fue la mutación básica "frameshith" la que se produjo para los 3 extractos de la muestra. Probablemente, el 1ª y 2ª extracto contuvieron el mismo genotóxico. Este producto químico debido a sus características, y elevada concentración en que se encontraba, podría haberse eluido en la 1ª Fr, para a continuación eluir en la 2ª Fr el resto del producto genotóxico.

La presencia del genotóxico en la muestra de F, podría estar ligado al aumento de la conductancia y turbidez de las aguas en este mes (Tabla 1), y cuyo origen podría haber sido la descarga de un vertido procedente de una gravera de las existentes en la zona. Sus vertidos no se sometieron a ningún tratamiento físico, previo a su liberación a las aguas del río, con la consiguiente aparición de sólidos en suspensión. La materia en suspensión podría haberse asociado a materia orgánica pre-existente en la zona, de origen natural (ácidos húmicos, etc.) o antropogénicos, impidiendo la autodepuración de las aguas.

La genotoxicidad detectada para la TA 1535/+S9/1ª y 2ªFr, podría deberse al mismo genotóxico de acción directa (-S9) que afecta a la TA 1538, ya que hay poca diversidad de vertidos en esta zona: 4 graveras, 3 ganadería y varios vertidos urbanos procedentes de zonas residenciales, con solo una depuradora para una ganadería. Por el contrario la genotoxicidad para esta muestra, podría provenir de un producto genotóxico distinto de acción indirecta (+S9) procedente de vertidos orgánicos (turbidez elevada, Tabla 1) con contenido en nitroderivados, reactivos y solubles en agua, los cuales parecen ser los más adecuados para ser detectados por la TA 1535.

La 1ª opción mencionada anteriormente, es decir, que se tratase del mismo genotóxico, es factible pues hay compuestos que en su estructura contienen mas de un grupo químico con propiedades potencialmente genotóxicas. El que se produzca un tipo de mutación u otra, dependerá de las condiciones más favorables, para las posibles reacciones, influyendo factores tales como la pureza del compuesto, el

procedimiento del ensayo, el metabolismo al cual está sometido, la molécula y su posible activación, además de la velocidad de reacción, entre otros (Chung y Cerniglia, 1992). De esta forma, el genotóxico que se detectó sin la activación metabólica/TA1538, al someterse a un tratamiento enzimático mediante la S9 pudo transformarse en un derivado o metabolito distinto inhibiendo la mutación "frameshift" a favor de la mutación que provoca sustituciones de pares de bases o pudo simplemente resultar la reacción en presencia de la activación metabólica S9 más eficaz.

Se han comentado los distintos puntos de muestreo indicando las cepas y fracciones mas favorables a cada uno, así como situaciones o procesos propios que han podido acontecer en cada punto debido a sus características. El analizar la calidad de las aguas en los diferentes puntos, según los valores de algunos parámetros fisico-químicos obtenidos (Tabla 1), se pretende junto con el tipo de vertido/s emitidos a las zonas obtener mas información, para caracterizar los posibles agentes mutagénicos. Los valores de índice de calidad de las aguas se compara con los límites establecidos para aguas superficiales destinadas a la posible producción de agua potable, con características similares a las del río Tajo (BOE, 1988c). En relación a la temperatura del agua, ésta aumenta por encima de los límites establecidos en todos los puntos desde el final de la primavera (My) hasta el inicio de otoño (S). En el resto de las determinaciones realizadas tanto "in situ" como en el laboratorio (estos últimos se suspendieron a partir de F de 1991), fue P1, seguido de P2 y en tercer lugar P3, los puntos donde se obtuvieron los índices de calidad mas bajos, para parámetros tales como conductividad, turbidez (excepto P2/N y P3/N, D, E, Jl y Fb), oxígeno disuelto, amonio (excepto los meses estivales en todos los puntos y en P3/O y D) y por último los fosfatos los cuales al igual que el amonio disminuye en los meses estivales, pero no por debajo de los límites de calidad establecidos. Para P4 y P5 la calidad de las aguas es diferente; en P4 los fosfatos se mantienen en el límite para la mayoría de los meses, superándose en los meses de E, Ag, y Ab, aunque siempre por debajo de los valores de P1 y P2 (excepto Ag). En relación al oxígeno disuelto, el P4 también muestra en la mayoría de los meses, valores mas bajos que el resto de los

puntos de muestreo, siendo los inferiores los correspondientes a Jn, Ag, y S. En P5 el parámetro a destacar resultó ser la turbidez, cuyos valores superaban en todos los meses excepto en Jl, los límites establecidos y alcanzando junto con P1 y P2 en algunos meses valores muy elevados (Tabla 1).

En general los valores de los parámetros obtenidos para los distintos puntos estaban en consonancia con la de los tipos de vertidos emitidos en ellos. Así en P1 y P2 donde predominaban los vertidos industriales y urbanos, (Sección, Descripción del área de estudio), se encontraban elevados los iones amonio y fosfato (característicos ambos de estos tipos de vertidos), únicamente en los meses invernales como comentamos arriba. El incremento de estos iones en éstas épocas, y en zonas próximas a poblaciones industriales contrasta con los bajos niveles obtenidos para el ion amonio en P4 y P5, y el ion fosfato en P5 (puntos localizados en zonas no industriales). Tal incremento de iones pudo por tanto, haberse producido por el aumento de la población e inicio de la actividad industrial en esos puntos y meses. La contaminación en P4 y P5 por este tipo de vertidos urbanos e industriales, por el contrario sería escasa, dada su localización por un lado, y los valores de los parámetros por otra. De esta forma, en P4 podríamos indicar que la contaminación detectada se deba a causas naturales, siendo los agentes producidos como consecuencia de esta contaminación, los posibles causantes de la genotoxicidad del punto. En P5 conocidos los valores de índice de calidad y la situación geográfica del punto, podría ser la existencia de las graveras de la zona sin tratamiento físico alguno la causa principal de contaminación. En P3, los vertidos existentes fueron menos numerosos que P1 y P2, y además fundamentalmente de tipo agrícola, ganadero, graveras y aguas residuales urbanas, aparte de la presencia del embalse de Azután. Con estos vertidos se generó primordialmente materia orgánica, derivados de nitrógeno, fosfatos y sólidos en suspensión, cuya presencia se evidenció claramente en los valores de índice de calidad que se obtuvieron para este punto, los cuales fueron siempre inferiores a los que se obtuvieron en P1 y P2.

Con los valores de índice de calidad de las aguas, obtenidos a lo largo del cauce del río estudiado, se manifiesta la escasez de tratamientos primarios y

secundarios, así como algunos mas específicos al tipo de vertido (Sección, Descripción del área de estudio), a que deben someterse los vertidos previamente a su emisión.

Con los datos disponibles, se ha observado cierta relación entre el grado de contaminación detectado para los diferentes puntos mediante algunos de los parámetros analizados y el grado de genotoxicidad que se detectó en cada uno. Así por ejemplo P1 y P2 fueron los puntos donde los índices de calidad se encontraban en situación mas crítica, siendo también los puntos donde mayor número de muestras genotóxicas se detectaron. Por otro lado, P4 cuyos índices de calidad eran críticos para parámetros tales como fosfatos elevados y concentración de oxígeno disuelto baja, se clasificó como el tercer punto en cuantía de muestras genotóxicas. A parte de los parámetros descritos arriba, otros como la temperatura del agua, la turbidez e incluso la conductividad establecen cierta relación, favoreciendo las condiciones de genotoxicidad. Así por ejemplo, el mayor número de muestras genotóxicas se detectaron en los meses donde las temperaturas eran mas elevadas. Otro parámetro que también parece determinante en cuanto a la genotoxicidad de las muestras es el pH, el cual para nosotros no ha mostrado influencia, debido a que para todas las muestras siempre se encontraba dentro de los límites establecidos. Numerosos autores (Ho y Quinn, 1993; Filipic, 1995), indican que en las fracciones ácidas se favorece la genotoxicidad, lo cual justifica en parte, que en aguas de bebida tratadas con derivados del cloro, se detecte mayor índice de genotoxicidad que en sus precursoras (Meier y cols. 1983; Earle y cols 1981).

En base al posible tipo de compuesto que había en el agua (vertido), sus características fisico-químicas (polaridad y solubilidad en agua), que determinan la fracción con la que se extrajó, así como la estructura molecular mas favorable para determinar la mutación (grupos aromáticos, alquilantes, metilantes, derivados de nitrógeno, etc.), nos sugiere la existencia de posibles productos genotóxicos causantes de la genotoxicidad detectada en el tramo estudiado del río Tajo.

Así por ejemplo, el/los genotóxico/s que se detectaron en la 1ª F. de las muestras para la cepa TA 1538 y TA 98, podrían haber sido algún biocida de uso común (carbamilatos, piretroides sintéticos, etc.) procedente de la industria agrícola o ganadera o algún producto originados como consecuencia de la degradación de vertidos urbanos, que contuvieran uno o varios grupos aromáticos alifáticos ó alicíclicos. Estos componentes al ser extraídos en la 1ª Fr tendrían que ser solubles en agua a pH aproximadamente neutro y en disolventes orgánicos, y no volátiles. El potencial genotóxico que se detectó en la 2ª Fr para la cepa TA 1535, indica que podría tratarse de algún compuesto procedente de la descomposición de la materia orgánica de vertidos orgánicos fácilmente degradables, de su interacción con componentes amoniacaes o podría tratarse del producto final de reacciones químicas producidas entre diversos tipos de compuestos presentes en el agua. Estas posibles reacciones degradativas podrían haber estado favorecidas por el aumento de la temperatura del agua, y a la mayoría de los productos genotóxicos que se detectaron para esta cepa en épocas de primavera-verano. Con la 2ª Fr de la muestra/TA 1535 parece poder detectarse un tercer grupo de productos genotóxicos, pudiéndose tratarse de un producto genotóxico mas estable que los anteriores, los cuales probablemente contendrían grupos mas apolares y menos reactivos, tal producto podría ser, el tóxico detectado en el Ensayo 1 con -/+S9/2ªFr/TA1535/P3/Ag, y en el Ensayo 2 unicamente sin la activación metabólica S9. Este producto genotóxico al estar en concentración elevada y/o ser menos reactivo, podría no haber sido eficaz el proceso detoxificador que se le proporcionaría al digerir la muestra con la activación metabólica S9. Sin embargo, la estabilidad del tóxico al realizar el Ensayo 2 (4 semanas después) podría estar empezando a decrecer, con lo que la muestra sufriría el proceso de detoxificación, no resultando por tanto tóxico en el Ensayo 2 con S9.

El posible genotóxico que indujo el único caso de reversión bacteriana para la cepa TA100 (-S9/2ªFr/P3/Ab), podría haber sido un insecticida hidrocarbonado clorado, dado el punto donde se detectó (DDT, DTE, etc.) los cuales, según numerosos autores, como ya hemos indicado, serían los más adecuados para ser detectados junto con otros organohalogenados por ésta cepa bacteriana. Estos

genotóxicos son solubles en la mayoría de disolventes orgánicos, siendo poco solubles en agua, lo cual coincide con la 2ª Fr, con la que se extrajo el genotóxico. La persistencia en el ambiente de los productos genotóxicos depende de factores físico-químicos con procesos de degradación lentos y escasos, lo cual podría justificar el resultado positivo obtenido para esta muestra del P3, cuando se realizó el Ensayo 2, a diferencia de otros genotóxicos cuya estabilidad es inferior, obteniéndose resultados diferentes en los Ensayos 1 y 2.

Además, tendremos que considerar la posibilidad de otro producto genotóxico, el "ácido dehidroabiético" probablemente presente en algunos extractos de las muestras de abril y mayo en todos los puntos de muestreo del río Tajo (excepto P5 que corresponde al río Alberche). Esta sustancia tóxica fue la que causó la muerte de los peces, lo cual comentamos al inicio de esta Discusión. La sustancia es una resina ácida que se ha considerado elemento tóxico en efluentes de pulpa de leche (OiKari y Linsstrom-Seppa, 1990), también aparece en extractos líquidos de carbón, biodegradados de petróleos, pinturas, gomas, plantas de tratamiento municipales, etc. (Muñoz y col., 1994). La mortalidad de los peces se observó inicialmente aguas abajo de la ciudad de Aranjuez, en la primavera del mismo año, en que nosotros realizábamos los muestreos. A petición del Centro Regional de Salud Pública de Talavera de la Reina, se cedió, parte de nuestras aguas, al Servicio de Toxicología Ambiental, CISA-INIA. En el mencionado laboratorio y mediante extracción líquido-líquido con cloruro de metilo, apareció en la fracción orgánica toxicidad. Posteriormente, la fracción orgánica se analizó mediante HPLC-MS, y se indentificó al ácido arriba indicado en la fracción tóxica (Muñoz y col., 1994). Esto indica, con bastante probabilidad, que este compuesto estaba presente en algunos de los extractos obtenidos a lo largo del cauce del río estudiado, en los meses de abril y mayo. En estos meses recogimos muestras genotóxicas de acción directa (-S9), para las 4 cepas ensayadas en cuantía diferente, y siempre en alguno de los extractos obtenidos en los puntos muestreados en el río Tajo (TA 1535/P1/1ª, 2ª y 3ª Fr/Ab y 3ª Fr/My; TA 1538/1ª Fr/P2/My/P4/Ab y My, 2ª Fr/P1/Ab y My/P4/Ab; TA98/1ª Fr y 2ª Fr/P1/Ab, 2ª Fr/P2 y P4/My, 3ª Fr/P2/Ab y TA 100/2ª Fr/P3/Ab) (Figs. 28, 29 y

30). Por tanto, al obtener respuesta genotóxica de acción directa, parece que el proceso de detoxificación en mamíferos sería efectivo a la hora de anular el potencial genotóxico y tóxico de las muestras, por el contrario dada la mortandad de los peces, ésta sería indicativa de la no eficacia del sistema detoxificante, en dichos animales.

A lo largo de esta discusión, en determinadas ocasiones nos hemos referido a la estabilidad de las muestras al comentar si los resultados del Ensayo 1 y Ensayo 2 mostraban el mismo carácter genotóxico o no, llegando a realizar en ocasiones un tercer ensayo, pues los caracteres de ausencia o presencia de genotoxicidad no coincidían. De las 86 muestras con actividad genotóxica en el Ensayo 1; en el Ensayo 2 sólo se han detectado 19; siempre con valores de IM inferiores a los del Ensayo 1, lo que indica que aunque el carácter genotóxico se mantenía, éste había disminuido. El carácter tóxico sólo se mantuvo en una ocasión. En el Ensayo 3 nunca se obtuvo respuesta positiva.

El carácter inestable de nuestras muestras se constata con los resultados obtenidos por nosotros y otros autores que han trabajado con el mismo tipo de muestras complejas y ambientales (Brown y Donnelly, 1984; Ho y Quinn, 1993 y Naudin y col., 1995).

Se pueden distinguir dos fases distintas en el proceso de inestabilidad de las muestras, la 1ª comenzaría a partir del momento en que se realiza el muestreo, debido al transporte y pasos de almacenamiento y procesamiento físico-químico hasta la aplicación del ensayo de mutagénesis. Lo cual, desde la recogida inicial de agua hasta la toma de la alícuota para el ensayo en el laboratorio, puede haber un notable cambio de contenido dependiendo siempre de las características de los compuestos que contenga la muestra.

Esta 1ª fase cabe la posibilidad de realizarla "in situ", con lo cual desaparecería la pérdida de compuestos orgánicos por la absorción de las paredes del recipiente, la posible precipitación de compuestos debido al pH, los cambios

producidos por la temperatura y potencial redox, la volatilación de algunos compuestos y la biodegradación por microorganismos que pueda contener la muestra. Por el momento este procedimiento no se ha llevado a cabo. Sin embargo, la técnica de concentración mediante cartuchos C_{18} , que hemos utilizado permite aplicar a cabo este procedimiento.

La 2ª Fase iniciaría una vez la muestra ha sido procesada, pues siguen existiendo posibles fenómenos químicos, foto-químicos y microbiológicos entre los componentes.

Hay autores que han ensayado en sus muestras los tiempos que estas mantienen su actividad tóxicas, pudiendo variar desde 1 semana en compuestos muy activos químicamente (cetonas, quinonas, grupos carboxilos, etc.), a 30 semanas en muestras con hidrocarburos no polares (Ho y Quinn., 1993) u otras incluso que pueden perdurar mas de 3 años como algunas muestras complejas de lixiviados en suelos (Brown y Donnelly, 1984).

El tiempo de persistencia para la mayoría de las muestras ensayadas resulta inferior a 4 semanas, pues es el tiempo que transcurrió desde la realización del Ensayo 1 al 2, y solamente algunas muestras mostraron una estabilidad superior a las 4 semanas. Se comprobó si las muestras en las que se había detectado actividad mutagénica correspondían a las muestras que se habían obtenido con el 2º extracto, el cual, resultó ser el más apolar y en teoría el más estable, y no se detectó diferencia significativa entre la estabilidad de las muestras de la 1ª Fr. y de la 2ª Fr.

Comparar nuestros resultados con los obtenidos por otros investigadores puede resultar complicado por algunos aspectos. En primer lugar estudios de genotoxicidad en las aguas del río Tajo únicamente se han realizado en una ocasión, como se indicará mas adelante, existiendo por tanto, pocos datos al respecto; en segundo lugar, el tema resulta muy amplio y enfocable desde diversos puntos de vista, ya que aunque en la bibliografía existen trabajos de mutagenicidad sobre aguas continentales, muchos de

ellos se limitan al estudio concreto del posible agente causante de la contaminación, a diferencia de este estudio, cuyos objetivos son bien diferentes como se comprueba en el capítulo de objetivos (pág. 58). En tercer lugar, la metodología del ensayo de mutagénesis propiamente dicho es el test de Ames, ensayo reconocido y admitido por numerosos organismos internacionales como hemos comentado. Hemos modificado el método de concentración de los posibles agentes genotóxicos, con el fin de obtener otro de nuestros objetivos. El método utilizado minicolumna cromatográfica C_{18} (Waters-Millipore) del cual existe muy poco bibliografía, y por tanto, poca información de estudios realizados con él.

En relación al método de concentración seleccionado se indica que previamente se realizaron pre-ensayos con otras técnicas (XAD, filtros de membrana, extracción líquido-líquido), comparando los resultados obtenidos con cada una de ellas. Asimismo se dilucidó sobre la precisión, grado de homegenicidad, reproducibilidad, rapidez, volumen de muestras empleadas para concentrar la materia orgánica y volúmenes de disolventes utilizados para extraer la materia orgánica retenida en la columna, etc. Todo ello indujo a seleccionar como técnica de concentración, la minicolumna C_{18} , la cual parecía la más adecuada para las características del agua muestreada. Además, esta técnica posee otras ventajas, las cuales no hemos aprovechado, como son el procesamiento de la muestra "in situ", evitando una pérdida y cambios de componentes de la muestra, como ya hemos comentado, al discutir la estabilidad de la muestra.

En relación al único trabajo citado en la bibliografía científica sobre la genotoxicidad de las aguas del río Tajo, (se señalan oportunamente las zonas muestreadas por nosotros) solicitado por el MOPU en 1990 a la empresa Contox S.A., utiliza en sus experimentos como método de concentración "membranas de filtración" disolviendo posteriormente el residuo seco en DMSO. Las muestras así obtenidas se ensayaron en el test de Ames. No se obtuvo actividad genotóxica en ninguna muestra, y sólo se detectó citotoxicidad en una de ellas localizada en la "Presa del Rey".

A la vista de los resultados obtenidos cabe indicar que la práctica bastante usual de hacer muestreos estacionales en campañas de vigilancia no es adecuada en este caso de estudio para el río Tajo, dada la variedad e inestabilidad de las muestras y al hacer muestreos estacionales de los IM obtenidos en los distintos puntos, se enmascara en la mayoría de los casos el carácter genotóxico de las muestras de agua. Por ejemplo en las muestras correspondientes a los tres meses de verano de P2/1^aFr/-S9/TA98, se obtiene un valor medio de 1,65, que no llega al umbral de mutagenicidad, siendo genotóxica la muestra correspondiente a J1 (2,31).

VII- CONCLUSIONES

Del análisis y discusión de los resultados de los ensayos llevados a cabo en este trabajo se extraen, las siguientes conclusiones:

1. En el río Tajo a su paso por la Comunidad Autónoma de Castilla-La Mancha se detecta presencia de sustancias mutagénicas.
2. Las zonas mas afectadas por la contaminación genotóxica son las mas próximas a la Comunidad Autónoma de Madrid (P1 y P2) lo que indica fuerte incidencia de sustancias genotóxicas en vertidos, probablemente originados en la Comunidad de Madrid y en ciudades como Toledo y Talavera de la Reina, grandes nucleos de población altamente industrializados.
3. Las aguas de los puntos de muestreo P3 (situado justo antes del límite entre las comunidades de Castilla-La Mancha y Extremadura) y P5 (tramo final del Río Alberche) son las que contienen menos sustancias genotóxicas; y las del P4, situado tras el embalse de Valdecañas, y único punto en la Comunidad de Extremadura, tienen también carácter genotóxico, siendo inferior al de los P1 y P2 y generado probablemente en procesos de eutrofización. Esto indica poca incidencia genotóxica de las aguas provenientes de la Comunidad de Castilla-La Mancha sobre la Comunidad de Extremadura y cierta autodepuración de las aguas en el tramo P2-P3.
4. En general la 1ª fracción de las muestras de todos los puntos son las que ostentan un mayor carácter genotóxico en el 45,3% de los casos, seguida de la 2ª fracción (37,2%) y de la 3ª (17,4%). Esto último pone de manifiesto el antagonismo entre los compuestos de la 1ª y 2ª fracción.
5. El porcentaje de muestras genotóxicas es máximo en los meses de verano (32,6% de los casos), decae de la primavera (27,3%) a otoño (23,1%) y es mínimo en invierno (16,8%), por tanto existe una variabilidad estacional.

6. Únicamente se detecta toxicidad con las cepas TA 1535 y TA 1538 (siendo considerablemente mas afectada la TA 1535), y en los meses de verano.
7. Existe relación entre el aumento de los valores de algunos parámetros de índice de calidad de las aguas analizados en los correspondientes puntos (conductividad, turbidez, amonio, fosfatos y oxígeno disuelto) y el aumento de sustancias genotóxicas.
8. En la totalidad del área de estudio existen mutágenos que inducen sustituciones de pares de bases, detectadas con la cepa TA 1535, pero hay en ella predominio de mutágenos que producen desplazamiento de lectura "frameshift" según los resultados obtenidos con las cepas TA 1538 y TA 98, (siendo en general mas sensible la TA 1538).
9. Los mutágenos "frameshift" aparecen en un 68,7% de los casos en la 1ª fracción de las muestras, (sustancias preferentemente solubles en agua a pH neutro y que son activas e inestables); y los que inducen sustituciones de pares de bases (alquilicas, metiladas, halogenadas, aminas, etc.) se extraen en un 73,9% en la 2ª fracción, (sustancias moderadamente solubles en disolventes polares a pH ligeramente ácido y menos activas químicamente que las que se extraen con el 1º extracto, son en general mas estables).
10. La cepa TA 100 que también detectan mutágenos inductores de sustituciones de pares de bases, no es sensible para el seguimiento de genotoxicidad de las aguas del Tajo ya que con ella tan solo se detectó un caso de genotoxicidad frente a los 31 casos determinados con la TA 1535.
11. La simulación del proceso detoxificante de mamíferos mediante la digestión con el extracto S9 anula el carácter genotóxico en el 70,8% de los casos, detectados en los extractos crudos por las cepas: TA 1535, 41,6%; TA 98, 37,5% y TA1538, 20,8%.

12. Las cepas de *Salmonella typhimurium* TA 1535 y TA 1538 son las mas sensibles para detectar genotoxicidad en esta zona del río, mientras que no es util la cepa TA100, en contra de lo postulado por algunos autores, Kamiyama y Ose (1987); Cerná y col. (1991; Filipic (1995))al indicar la suficiencia de las cepas que poseen el factor R (TA 100 y TA 98), en la detección de agentes genotóxicos que inducen el mismo tipo de mutación básica.

VIII- BIBLIOGRAFÍA

- ADRIANO, D.C. (1986). Trace elements in the terrestrial environment. Springer-Verlag, New York, etc. 533 pp.
- AGUILO, M. (1983). El agua de Madrid. Diputación de Madrid. Area de Urbanismo y ordenación Teritorial. Madrid.
- AMES, B. N.; McCANN, J. & YAMASAKI, E. (1975). Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/Mammalian microsome mutagenicity test. *Mutat. Res.*, **31**: 347-364.
- ASHBY, J. (1986). The prospects for a simplified and internationally harmonized approach to the detection of possible human carcinogens and mutagens. *Mutagenesis*, **1**: 3-16.
- ASHBY, J. & PURCHASE, I.F.H. (1985). Significance of the genotoxic activities observed *in vitro* for 35 of 70 NTD noncarcinogens. *Environm. Mutagen.*, **7**: 747-758.
- ASHBY, J. & TENNANT R.W. (1988). Chemical structure, Salmonella mutagenicity and extent of carcinogenicity as indicators of genotoxic carcinogenesis among 222 chemicals test in rodents by the U.S. NTP. *Mutat. Res.* **204**: 17-115.
- ASHBY, J., TENNANT R.W., ZEIGER, E. & STASIEWICZ, S. (1989). Classification according to chemical structure, mutagenicity to Salmonella and level of carcinogenicity of a further 42 chemicals tested for carcinogenicity by the U.S. National Toxicology Program. *Mutat. Res.* **223**: 73-103.
- ASHBY, J., TENNANT, R.W. (1991). Definitive relationships among chemical structure, carcinogenicity and mutagenicity for 301 chemicals test by the U.S. NTP. *Mutat. Res.*, **257**: 229-306.
- AUERBACH, C & KILBEY, B. J. (1971). Mutation in Eukariotes. *Ann. Rev. Genet.* **5**: 163-218.
- AULETTA, A. (1990). Current status of short-term tests for carcinogenicity. *Envir. Carcino. Revs. (J. Envir. SCI. HLTH)*. **G8 (1)**; 1-43.
- BABICH, H. & STOTZKY G.; (1983a). Temperature, Ph, salinity, hardness, and particulates mediate nickel toxicity to eubacteria, an actinomycete, and yeast in lake, simulated estuarine, and sea waters. *Aquatic Toxicol.* **3 (3)**: 195-208.
- BABICH, H. & STOTZKY G.; (1983b). Physicochemical factors of natural reservoirs affect the transformation and exchange of heavy metals toxic to microbes. *Environ. Biogeochem. Ecol. Bull.*, **35**: 316-323.
- BABICH, H. & STOTZKY G.; (1983c). Developing standards for environmental toxicants: the need to consider abiotic environmental factors and microbe-mediated ecologic processes. *Environ. Health Perspectives*, **49**: 247-260.
- BABICH, H.; DEVANAS, M. A. & STOTZKY, G. (1985). The mediation of mutagenicity and clastogenicity of heavy metals by physicochemical factors. *Environ. Res.*, **37**: 253-286.

- BARTSCH y col. (1982). Metabolic activation systems in vitro for carcinogen/mutagen screening test. In: de Serres, F. J. and Hollaender, A. eds. *Chemical Mutagens-Principles and Methods for their detection*, vol. 7: New York Plenum, pp. 95-161.
- BARTSCH, H., MALAVEILLE, C., CAMUS, A.M., MARTEL-PLANCHE, G., BRUN, G., HANLEFLUILLE, A., SABADIE, N., BARBIN, A., KUROKY, T., DREVON, D., PICCOLI, C. and MONTESANO, R. (1980). Bacterial and mammalian mutagenicity test: validation and comparative studies on 180 chemicals. *Mutat. Res.*, **76**: 1-50.
- BECHER, G.; CARLBERG, G.E.; GJESSING, E.T.; HONGSLO, J.K. & MONARCA, S. (1985). High-performance size exclusion chromatography of chlorinated natural humic water and mutagenicity studies using the microscale fluctuation assay. *Environ. Sci. Technol.*, **19**: 422-426.
- BENES, P.; CEJCHANOVA, M. & HAVLIK B. (1985). Migration and speciation of lead in a river system heavily polluted from a smelter. *Water Res.*, **19** (1): 1-6.
- BENIGNI, R.; ANDREOLI, C. & GIULIANI, A. (1989). Quantitative structure-activity relationships: principles, and applications to mutagenicity and carcinogenicity. *Mutat. Res.*, **221**: 197-216.
- BENIGNI, R. & GIULIANI, A. (1991). What Indication is common to different genotoxicity data bases?. *Mutat. Res.*, **253**: 115-121.
- BINDRA, K.S. & HALL, K.J. (1978). Bioaccumulation of selected trace metals by benthic invertebrates in laboratory bioassays, Unpublished report for NRC, Ottawa, Canada. 25 págs.
- BISHOP, J.M. (1985). Trends in oncogenes. *Trends Genet.* **12**: 245-249.
- BOE (1985a). Ley de Aguas del 2 de Agosto de 1985 (BOE 8 de agosto de 1985)
- BOE (1985b). Real Decreto 2216/85 del 23 de octubre de 1985, Productos Químicos. Reglamento sobre declaración de sustancias nuevas y clasificación, envasado y etiquetado de sustancias peligrosas. (BOE: 26 y 27-11-1985)
- BOE (1986). Ley Básica de Residuos Tóxicos y Peligrosos 20/1986 del 14 de mayo de 1986. (BOE: 20-5-1986).
- BOE (1988a). Real Decreto 833/1988, de 20 de julio, por el que se aprueba el Reglamento para la ejecución de la Ley 20/1986, Básica de Residuos Tóxicos y Peligrosos. (BOE: 30-7-1988)
- BOE (1988b). Relativa a los métodos de medición y la frecuencia de muestreo y análisis de aguas superficiales que se destinan a la producción de agua potable. Orden Ministerial del 8-2-1988 (BOE: 2-3-1988).
- BOE (1988c). Orden de 11 de mayo de 1988 sobre características básicas de calidad que deben ser mantenidas en las corrientes de aguas superficiales cuando sean destinadas a la producción de agua potable. (BOE: 24-5-1988).

- BOE (1989). Orden de 13 de octubre de 1989 por la que se determinan los métodos de caracterización de los residuos tóxicos y peligrosos. (BOE: 10-11-1989).
- BROWN, K., & DONNELLY, K (1984). Mutagenic Activity of Runoff and Leachete Water from Hazardous Waste Land Treatment. *Environ. Pollution (series A)* **35**: 229-246,
- BRÜMMER, G.W. (1986). Heavy metal species, mobility and availability in soils. En: *The Importance of Chemical "Speciation" in Environmental Processes*. Dahlena Konferenzen, 1986. M. Bernhard; F.E. Brinckman & P.J. Sadler (Eds). Springer-Verlag, Berlin, etc. págs: 169-192.
- BRUSICK, D. (1988). Evolution of testing strategies for genetic toxicity. *Mutat. Res.*, **205**: 69-78.
- BRUSICK, D. & AULLETA A. (1985). Developmental status of bioassays in genetic toxicology. *Mutat. Res.*, **153**: 1-10.
- BRYAN, G.W.; (1976). Heavy metal contamination in the sea. En: *Marine pollution*. R. Johnston (Ed), Academic Press, London, pp. 185-302.
- BUDAVARI, S. ed (1989). *The Merck index: an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals*, 11 th ed. Rahway New Jersey, Merck & Co., Inc. p 63.
- BULL, R.J.; ROBINSON, M.; MEIER J.R. & STOBBER J. (1982). The use of biological assay systems to assess the relative carcinogenic hazards of disinfection by products. *Environ. Health Perspect.*, **46**: 215-227.
- CABALLO DIEGUEZ G.C. (1991). estudio genotóxico de los insecticidas piretroides, deltametrin y fenvalerato utilizando cultivos *in vitro* de células de ovario de hamster chino. Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid.
- CANTOR, K. P.: (1982). Epidemiological evidence of carcinogenicity of chlorinated organics in drinking water: *Environ. Health Perspect.*, **46**: 187-95.
- CARLBERG, G.E.; DRANGSHOLT, H. & GJOS, N. (1986). Identification of chlorinated compounds in the spent chlorination liquor from differently treated sulphite pulps with special emphasis on mutagenic compounds. *Sci. Total Environ.*, **48**: 157-167.
- CARLBERG, G.E.; GJOES, N.; MOELLER, M.; GUSTAVSEN, K.O.; TVETEN, G. & RENBERG, L. (1980). Chemical characterization and mutagenicity testing of chlorinated trihydroxybenzenes identified in spent bleach liquors from a sulfite plant. *Sci. Total Environ.*, **15**: 3-15.
- CASARETT & DOULL'S. (1986). *Toxicology. The Basic Science of Poisons*. Third edition. Macmillan Publishing Company. (N. York).
- CATALÁN L. & CATALÁN A. (1987). *Rios caracterización y calidad de sus aguas. Dihidrox, Zamora*.
- CEE (1979) 79/831/CEE. Boletín CEE 12-10-1979

- CEE (1980) Directiva del Consejo del 15 de julio de 1980, Relativa a la calidad de las aguas destinadas al consumo humano. 80/778/CEE. Boletín CEE 30-8-1980.
- CEE (1984) 84/449/CEE. Boletín CEE 19-9-1984
- CEE (1987) 87/302/CEE. Boletín CEE 30-5-1987
- CERNÁ, M., HÁJEK, V., STEJSKALOVÁ, E. DOBIÁS, L., ZUDOVÁ, Z. & RÖSSNER, P. (1991). Environmental genotoxicity monitoring using *Salmonella* Typhimurium strains as indicator system. *The Science of the Total Environment*. **101**: 139-147.
- CHUNG, K-T & CERNIGLIA, C. (1992). Mutagenicity of aza dyes: structure-activity relationships. *Mutat. Res.* **277**: 201-220.
- CHUNG, K-T (1983). The significance of azo-reduction in the mutagenesis and carcinogenesis of azo dyes. *Mutation Res.* **114**: 269-281.
- CLAXTON, L.D.; STEAD, A.G. & WALSH, D. (1988). An analysis by chemical class of *Salmonella* mutagenicity test as predictors of animal carcinogenicity. *Mutat. Res.*, **205**: 197-225.
- CLAYTON, G. D. & CLAYTON, F.E. ed (1982). Patty's industrial hygiene and toxicology. Volume 2C - Toxicology with cumulative index for Volume 2, 3rd ed. New York, Chichester, Brisbane, Toronto, John Wiley & Sons.
- COMMONER, B.; VITHAYATHIL, A. & DOLORA, P.: (1978). Mutagenic analysis of complex samples of air particulates, aqueous effluents, and foods. Presented at the Symposium on Application of Short-Term Bioassays in the Fractionation and Analysis of Complex Environmental Mixtures, Williamsburg, Virginia .
- CONFERENCE on Phthalates (1982): Discussion and summary remarks. *Environ. Health Perspect.*, **45**: 149-53.
- CONTOX (1990). Estudio del agua sobre diversos puntos de muestreo. Ensayo de Reversión Mutagénica. *Salmonella Typhimurium*. MOPU.
- COVA, D.; MOLINARI, G. & ROSSINI, L. (1990). Focus on toxicological aspects of pesticide chemical interaction in drinking water contamination. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **20**:234-240.
- CRANSTON, R.E. & MURRAY, J.W. (1978). The determination of chromium species in natural waters. *Anal. Chim. Acta*, **99**: 275-282.
- CRUMP, K. S., & GUESS, H. A.: (1980). Drinking water and cancer: review of recent findings and assessment of risks. Prepared for the Council on Environmental Quality, Washington, D.C.
- CUBILLO, F. (1986), Situación actual de la calidad de las aguas en los ríos de la Comunidad de Madrid. Colección del PIAM nº9. Comunidad de Madrid, Consejería de Obras Públicas y Transportes, Direc. Gral. de Re. Hidr. Madrid. 339 págs.

- DEARFIELD, K.L. (1989), Potencial EPA/CPP mutagenicity testing requirements guidelines revisions. *Environ. Mol. Mutagen.* **14** (Suppl. 15): 47
- DEARFIELD, K.L.; AULETTA, A.E.; CIMINO, M.C. & MOORE M.M. (1991). Considerations into U.S. Environmental Protection Agency's testing approach for mutagenicity. *Mutat. Res.*, **258**: 259-283
- DELLARCO, V.L.; VOYTEK, P.E. & HOLLAENDER A. (1986). Aneuploidy: Etiology and Mechanisms, Basic Life Sciences. Vol. 36, Plenum, New York and London.
- DE SERRES, F.J. & ASHBY, J. (Eds) (1981). Evaluation of short-term test for carcinogens: Report of the international collaborative program. *Progress in Mutation Research*, vol 1, Elsevier/North-Holland, Amsterdam.
- DE SERRES, F. J. & SHELBY, M. D. (1979). Recommendations on data production and analysis using the Salmonella/microsome mutagenicity assay. *Mutat Res*, **64**: 159-165.
- DOLL & PETO (1981). The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. *J. Natl. Cancer Inst.*, **66**: 1193-1308.
- DUTKA B.J.; JOVA, A. & BRECHIN, J. (1981). Evaluation of four concentration/extraction procedures on water and effluent collected for use with the *Salmonella typhimurium* screening procedure for mutagens. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **27**: 758-764.
- EPLER, J.L.; YOUNG, J.A.; HARDIGREE, D.A.; RAO, T.K.; GUERIN, M.R.; RUBIN, I.B.; HO, C.H. & CLARK B.R. (1978). *Mutat. Res.*, **57**: 265
- FILIPIC, M. (1995) Mutagenicity and toxicity of water extracts from the Sora river area. *Mutat. Res.*, **342**: 1-8.
- FLORIN, M.; MONTES. C.; CASADO, C. & GARCIA DE SALON (1987). *Bibliografía para el estudio de las aguas superficiales de la Comunidad de Madrid*. Ed. Univ. Autónoma de Madrid, Madrid
- FONTANE, J.C. (1981). Introducción al Sep-Pak. *Técnicas de Laboratorio*. **118**: 34-37.
- FORNI, A. & BERTAZZI, P.A. (1987). Epidemiology in protection and prevention against environmental mutagens/carcinogens. *Mut. Res.* **181**: 289-297.
- FORSTER, R. & WILSON, J. (1981). The application of mutagenicity testing to drinking water. *JIWES*, **35**: 259-274.
- FÖRSTNER, U. & PROSI, F. (1979). Heavy metal pollution in freshwater ecosystems. En: *Biological Aspects of Freshwater Pollution*. O. Ravera (Ed), Commission of the European Communities. Pergamon Press. Págs 129-161.
- FÖRSTNER, U. & WITTMANN, G.T.W. (1981). Metal pollution in the aquatic environment. Springer-Verlag, Berlin, etc. 2ª revised edition. 486 págs.

- FREEDMAN, M.L.; CUNNINGHAM, P.M.; SCHINDLER, J.E. & ZIMMERMAN M.J. (1980). Effect of lead speciation on toxicity. *Bull. Environ. Contam. Toxic.*, **25**: 389-393.
- FRIEDBERG, M.A. (1985). *DNA Repair*, Freeman, New York.
- FRIEND, S. (1990). The genetic basis of cancer. En: *Molecular Genetics in Cancer Diagnosis*, J. Crossman, Elsevier.
- DE LA FUENTE, L. y FRUTOS, J. (1995). *Toxicología y seguridad química: Evaluación y Gestión del Riesgo Químico*. Comunidad de Madrid. Consejería de Sanidad y Servicios Sociales.
- GARCIA PUERTAS, P. (1991). Aspectos toxicológicos de las aguas. *Anales de Bromatología*, **XLIII**-2/3: 239-255.
- GARCIA-SAGREDO, J. M. & MONTEAGUDO, J. L. (1991). Effects of low-level pulsed electromagnetic fields on human chromosomes in vitro: analysis of chromosomal aberrations. *Hereditas* **115**:9-11.
- GARNER, R.C.; MILLER, E.C. & MILLER, J.A. (1972). Liver microsomal metabolism of aflatoxin B, to a reactive derivative toxic to *Salmonella typhimurium* TA1530. *Cancer Res.*, **32**: 2058-2066.
- GENGFU, X.; FEI, T. & JIALING, W. (1994). Influence of biological oxidation pretreatment of raw water on reduction of mutagens in drinking water. *China Environ. Sci.*, **5** (1): 79-84.
- GINER-SOROLLA, A. (1986). Carcinogénesis química. En : *Bioquímica y Biología Molecular. Temas de actualidad para graduados*. Severo Ochoa, Luis F. Lelovi, Juan Oro, Alberto Sols. Salvat, Barcelona, págs : 543-553.
- HAHNE, H.C.H. & KROONTJE W.; (1973). Significance of Ph and chloride concentration on behaviour of heavy metal pollutants: Mercury (II), Cadmium (II), Zinc (II), and Lead (II). *J. Environ. Qual*, **2**: 444-450.
- HEDDIE, J.A. (1988). Prediction of chemical carcinogenicity from *in vitro* genetic toxicity. *Mutagenesis*, **3** (4): 287-291.
- HERRERA, A. (1987). Estudio genotóxico de piretroides utilizando mutantes de *Salmonella typhimurium*. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Madrid.
- HERRERA, A. y DE LA PEÑA, E. (1989). Genotoxicidad/Carcinogenicidad de los plaguicidas. *Rev. Toxicología*, **6**: 353-367.
- HERRERA, A. y DE LA PEÑA, E. (1991). Genotoxicidad de los plaguicidas. *Rev. ToxicologRa*. **8**: (en prensa).
- HIGGINS, I. & BURN, Y. (1975). *The chemistry and microbiology of pollution*. Acad. press, London.

- HO, D. T. Y. & QUINN, J. G. (1993) Physical and chemical parameters of sediment extraction and fractionation that influence toxicity, as evaluated by Microtox. *Environ. Toxicol. Chem.*, **12**: 615-652.
- HOEHN, R. C.; DIXON, K. L.; MALONE, J. K.; NOVAK, J. T. & RANDALL, C. W. (1984) Biologically induced variations in the nature and removability of THM precursors by alumn treatment. *Journal AWWA*, **76**(5): 134-141.
- HOFNUNG, M. & QUILLARDET, P. (1986). Recent developments in bacterial short-term tests for the detection of genotoxic agents. *Mutagenesis*, **1**: (5), 319-330.
- HOLLSTEIN, M. & McCANN, J. (1979). Short-term test for carcinogens and mutagens. *Mutat. Res.*, **65**: 133-266.
- IARC (1980). Long-term and short-term screening assays for carcinogens: a critical appraisal. *IARC Monographs*, **2**: 426.
- IARC (1986). Long-term and short-term assays for carcinogens: a critical appraisal. *IARC Monographs*, **83**: 167-243.
- IARC (1987 a). *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. GENETIC AND RELATED EFFECTS: AN UPDATING OF SELECTED IARC MONOGRAPHS. Volumes 1 to 42. Supplément 6 Part I: A to H.* Lyon, Francia.
- IARC (1987 b). *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. OVERALL EVALUATIONS OF CARCINOGENICITY: AN UPDATING OF IARC MONOGRAPHS. Volumes 1 to 42, Supplément, 7.*
- IARC (1987c) *IARC Monographs en Evaluation of Cardinogenic Risk of Chemicals to Humans, Revised Preamble*, IARC, Lyon ice Press.
- IARC (1991). *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. PYRETHROIDS. Volumen 53 (en prensa).*
- ICPEMC: Committe 1 Final Report (1983). Screening strategy for chemicals that are potencial germ-cell mutagens in mammals. *Mutation Research*, **114**: 117-177.
- IPCS (1993). *International Programe on Chemical Safety. World Health Organization. Environmental Health Criteria 154 Acetonitrile.* Genova.
- JAMES, B.R. & BARTLETT, R.J. (1983a). Behavior of chromium in soils: VI. Interaction between oxidation-reduction and organic complexation. *J. Environ. Qual.*, **12**: 173-176.
- JAMES, B.R. & BARTLETT, R.J. (1983b). Behavior of chromium in soils: VII. Adsorption and reduction of hexavalent form. *J. Environ. Qual.*, **12**: 177-181.
- JOHNSON, J.D.; CHRISTMAN, R.F.; NORWOOD, D.L. & MILLINGTON, D.S. (1982). Reaction products of aquatic humic substances with chlorine. *Environ. Health Perspect.*, **46**: 63-71.
- JOLLEY, R.L. (1987). Conference Summary and Perspectives. En: *Water Chlorination: Chemistry, Environmental Impact and Health Effects*; Lewis Pub., **6**: 973-975.

- KAMIYA, A., & OSE, Y. (1987). Study of the behaviour of mutagens in wastewater and emission gas from a municipal incenerator evaluated by means of the Ames Assay. *Sci. Total Environ.*, **65**: 109-120.
- KANAREK, M. S., & YOUNG, T. B. (1982). Drinking water treatment and risk of cancer death in Wisconsin. *Environ. Health Perspect.*, **46**: 179-86.
- KIER, L.D.; BRUSIAK, D.J.; AULETTA, D.E.; VON HALLE, E.S.; BROWN, M.M.; SIMMOU, V.F.; DUNKEL, V.; MCCANN, J.; MORTELMANS, K.; PRIVAT, M.; RAO, T.K. & RAY, V. (1986). The Salmonella typhimurium, mammalian microsomal assay. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutat. Res.* **168**: 69-240.
- KILIKIDIS, S.D.; KAMARIANOS, A.P. & KARAMANLIS, X.N. (1992) Seasonal fluctuations of organochlorine compounds in the water of the Strimon river (N. Greece). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **49**: 375-380.
- KINAE, N.; SUGIYAMA C.; NASUDA, M.Y.; GOTO N.K.; TOKUMOTO, K.; FURUGORI, M. & SHIMOI, K. (1992). Seasonal variation and stability of chlorinated organic mutagens in drinking water. *Wat. Sci. Tech.*, **25**: 333-340.
- KIRSCH-VOLDERS, M.; RADMAN, M.; JEGGO, P. & VERSCHAEVE, L. (1984). Molecular mechanism of mutagenesis and carcinogenesis. En: *Mutagenicity carcinogenicity and teratogenicity of industrial pollutants*. KIRSCH-VOLDERS, M. (Ed), Plenum Press, págs: 5-58.
- KLUWE, W.M.; HASEMAN, J.K. & HUFF, J.E. (1983). The carcinogenicity of di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) in perspective. *J. Toxicol. Environ. Health*, **12**: 159-169.
- KOOL, H.J. & VAN KREYL, C.F. (1981). The use of XAD-resins for the detection of mutagenic activity in water. II. Studies with surface water. *Chemosphere*, **10**: 85-98.
- KOPFLER, K.P.; RINGHAND, H.P.; COLEMAN, W.E. & MEIER, J.R. (1984). Reaction of chlorine in drinking water, with humic acids and *in vivo*. EPA 600/D-84/196.
- KRINGSTAD, K.P.; DE SOUSA, F. & STROMBERG, L.M. (1985). Studies on the chlorination of chlorolignins and humic acid. *Environ. Sci. Technol.*, **19**: 427-431.
- KRONBERG, L. & VARTIAINEN, T. (1988) Ames mutagenicity and concentration of the strong mutagen 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone and of its geometric isome E-2-chloro-3-(dichloromethyl)-4-oxo-butenic acid in chlorine treated tap waters. *Mutation Research*, **206**: 177-182.
- LEMOES, C., VARGAS, V., HENRIQUES, J. & MATTEVI, M (1994).. Genotoxicity of river water under the influence of petrochemical industrial complexes. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **52**: 848- 855.

- LLANGOSTERA, M. (1989). Standardization and evaluation of metabolic activation systems using plant and human red cells. 18th Meeting of the Contact Group. Córdoba, March XII/ENV/5/89.
- LOWRY y col. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. **193**: 265-275.
- LU, A.Y.H. (1976). Liver microsomal drug metabolizing enzyme system: functional components and their properties, Fed. Proc., **35**: 2460-2463.
- LUTZ, W.K. (1990). Endogenous genotoxic agents and processes as a basis of spontaneous carcinogenesis. Mutat. Res., **238**: 287-295.
- MA, T-H; SANDHU, S.S.; PENG, Y.; CHEN, T.D. & KIM, T.W. (1992). Synergistic and antagonistic effects on genotoxicity of chemicals commonly found in hazardous waste sites. Mutat. Res., **270**: 71-77.
- MALAVEILLE C., KURIKI, T., BRUN, G., HANTEFENILLE, A., CAMUS, A. M. & BARTSCH, H. (1979). Some factors determinind the concentration of liver proteins for optimal mutagenicity of chemicals in the Salmonella/microsome assay. Mutat. Res., **63**: 245-258.
- MARON, D.M. & AMES, B.N. (1983) Revised Methods for the salmonella mutagenicity test. Mutat. Res., **113**: 173-215.
- MARUOKA, S. & YAMANAKA, S. (1983a) Mutagenic potential of laboratory chlorinated river water. Sci.Total Environ., **29**: 143-154.
- MARUOKA, S. & YAMANAKA, S. (1983b). Comparative studies using the Ames *Salmonella*/microcosmos test on mutagenicity of XAD extract recovered from the river waters in Kyoto city. Environ. Sci. Technol., **17**: 177-180.
- MASON, C.F.; (1984). Biología de la contaminación del agua dulce. Ed. Alhambra.
- MATISOFF, G.; FISHER, J.B. & MATIS S. (1985). Effects of benthic macroinvertebrates on the exchange of solutes between sediments and freshwater. Hydrobiologia, **122**: 19-33.
- MATTERN, I.E. (1981). Basis of evaluation of an Ames test. Prog. Mutat. Res., **2**: 187-190.
- MCCANN, J. & AMES, B.N. (1976). detection of carcinogens as mutagens in the *Salmonella* microsome test: Assay of 300 chemicals. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), **73**: 950-954.
- MCCANN, J.; CHOI, E.; YAMASAKI, E. & AMES B.N. (1975). Detection of carcinogens as mutagens in the *Salmonella*/microsome test: Assay of 300 chemicals. Proc. Natl. Acad. Sci., **72**, 5135-5139.
- MEIER, J. R.; LINGG, R. D. & BULL, R. J. (1983) Formation of mutagens following chlorination of humic acid. A model for mutagen formation during drinking water treatment. Mutat. Res., **118**: 25-41.

- MILLER, E.C. & MILLER J.A. (1981). Searches for ultimate chemical carcinogens and their reactions with cellular macromolecules. *Cancer*, **47**: 2327
- MONARCA, S.; HONGSLO, J.K.; KRINGSTAD, A. & CARLBERG, G. (1985). Microscale fluctuation assay coupled with sep-pak^R concentration as a rapid and sensitive method for screening mutagens in drinking water. *Water Res.* Vol. 19, No. 10, 1209-1216..
- MONOGRAFIAS de la Dirección G. de Medio Ambiente (1989). Residuos Tóxicos y Peligrosos, Tratamiento y Eliminación. MOPU.
- MORIYA, M. (1983). Further mutagenicity studies and pesticides in bacterial reversion assay. *Mutat. Res.*, **119**: 95-102.
- MORTELMANS, K; HAWORTH, S.; LAWLOR, T; SPECK, W.; TAINER, B. & ZEIGER, E. (1986) Salmonella mutagenicity tests: II. Results from the testing of 270 chemicals. *Environ Mutagen*, **8**(Suppl 7): 1-119.
- MULLER, H.-G. (1980). Acute toxicity of potassium dichromate to *Daphnia magna* as a function of the water quality. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **25**: 113-117.
- MUNSONG, A.E.; SAIN, L. E.; SANDERS, V.M.; KAUFFMANN, B. M.; WHITE, K. L., JR.; PAGE, D.G.; BARNES, D.W.; & BORZELLECA, J.F.(1982). Toxicology of organic drinking water contaminants: trichloromethane, bromodichloromethane, dibromochloromethane, and tribromomethane. *Environ. Health Perspect.*, **46**:117-26.
- MUÑOZ, M.J.; CASTAÑO, A.; BLAZQUEZ, T.; VEGA, M. CARBONELL, G.; ORTIZ, J.A.; CARBALLO, M. y TARAZONA, J.V. (1994). Toxicity identification evaluations for the investigation of fish kills: a case study. *Chemosphere*, Vol. 29, N° 1, pp. 55-61.
- MURPHY, C.B.Jr. & SPIEGEL, S.J. (1982). Bioaccumulation and toxicity of heavy metals and related trace elements. *J. Water Pollut. Control Fed.*, **54**: 849.
- MURPHY, C.B.Jr. & SPIEGEL, S.J. (1983). Bioaccumulation and toxicity of heavy metals and related trace elements. *J. Water Pollut. Control Fed.*, **55**: 816-822.
- NASU, Y.; KUGIMOTO, M.; TANAKA, O. & TAKIMOTO, A. (1983). Comparative studies on the absorption of cadmium and copper in *Lemna paucicostata*. *Environ. Pollut. Ser. A*. **32**: 201-209.
- NATARAJAN, A.T.; TATES, A.D.; VAN BUUL, P.P.W.; MEYERS, M. & VOGEL N. (1976). Citogenetic effects of mutagens/carcinogens after activation in a microsomal system in vitro I. Introduction of chromosome aberrations and sister chromatid exchanges by diethylnitrosamine (DEN) and dimethyl-nitroamine (DMN) in CHO cells in the presense of rat-liver microsomes. *Mutat. Res.* **37**, 83-90.

- NATIONAL Research Council: Drinking Water and Health. National academy of Sciences, Washington, D.C. Vol. 1, 1977; Vol. 2, 1980; Vol. 3, 1980; Vol. 4, 1982; Vol. 5, 1983
- NAUDIN, S.; GARRIC, J.; VINDIMIAN, E.; BRAY, M.; MIGEON, B.; VOLLAT, B. & LENON, G. (1995). Influence of the sample preservation mode to assess the chronic toxicity of an industrial effluent. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **30**: 54-62.
- NEAL, M.W.; MASON, L.; SCHWARTZ, D.J. & SAXENA, J. (1981). Assessment of mutagenic potential of mixtures of organic substances in renovated water. EPA-600/1-81-016.
- NEMEROW (1977). Aguas residuales industriales, teorías, aplicaciones, tratamientos. Blume. H. (Ed), Madrid.
- OCDE, (1986). Lignes directrices sur l'utilisation des tests de mutagenicite pour l'evaluation toxicologique des produits chimiques. Ottawa. Canada.
- OIKARI, A. & LINDSTROM-SEPPA, P. (1990) *Chemosphere*. **20**: 1079-1085.
- OMURA, M.; INAMAGU, T. & ISHINISHI, N. (1991). Mutagenicity Assays of leachate from domestic waste landfills in Japan: the establishment of a protocol for measuring mutagenicity levels of leachate. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **45**: 561-568.
- OPS/OMS (1980). Criterios de Salud Ambiental. 6. Principios y métodos para evaluar la toxicidad de las sustancias químicas. Parte I. OPS/OMS (eds).
- DE LA PEÑA y col. (1988). Sistemas de actuación metabólica. *Rev. Toxicol.*, **5**: 33-38.
- DE LA PEÑA, E.; BARRUECO, C.; HERRERA, A. & GARCIA PARTIDA P. (1990). Genotoxicidad: una alternativa a la experimentación animal. *Rev. Exp. Animal*, **1**: 41-52.
- PESSON, P. (1979) Contaminación de las aguas continentales. Mundi-Prensa. Madrid.
- PODDUBNAYA, T. L.; (1980). Life cycles of mass species of Tubificidae. En: *Aquatic Oligochaeta Biology*. R. O. Brinkhurst y D. G. Cook (Eds), Plenum Press, NY. Págs. 175-184.
- PROSI, F. (1981). Heavy metals in aquatic organisms. En: *Metal pollution in the Aquatic Environment*, (Cap. F). U. F'rstner and G.T.W. Wittmann (Eds), Springer-Verlag, Berlin etc. pags. 271-323.
- PURCHASE, I.F.H. (1982). An appraisal of predictive tests for carcinogenicity. *Mutat. Res.*, **65**: 133-216.
- QUILLARDET, P.; DE BELLECOMBE, C. & HOFNUNG, M. (1985). The SOS Chromotest, a colorimetric bacterial assay for genotoxins: validation study with 83 compounds. *Mutat. Res.*, **147**, 79-95.

- RAPSON, W.H.; NAZAR, M.A. & BUTSKY, V.V. (1980). Mutagenicity produced by aqueous chlorination of organic compounds. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **24**: 590-596.
- RAV-ACHA, C. & BLITS, R. (1985). The different reaction mechanism by which chlorine and chlorine dioxide react with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in water. *water Res.*, **19**: 1273-1281.
- REPETTO, M. & VETTORAZZI, G. (1983). Complejidad de la toxicología moderna. *Rev. Toxicol.* **1**: 5-13.
- RINKUS, S.J. & LEGATOR (1979). Chemical characterization of 465 know or suspected carcinogens and their correlation with mutagenic activity in the *Salmonella typhimurium* system. *Cancer Res.*, **39**: 3289-3318.
- ROBERTFROID, M.B. (1980). Metabolic activation of drugs in mutagenicity test *in vitro*. *Arch. Toxicol.*, **46**: 181-193.
- ROSENKRAUZ, H.S.; ZHANG, Y.P. & WLOPMAN, G. (1991). Implications of newly recognized relationships between mutagenicity, genotoxicity and carcinogenicity of molecules. *Mutat. Res.*, **250**: 25-33.
- ROVIRA, J. V. (1993) Contaminación por metales pesados en los sedimentos del río Jarama y su bioasimilación por tubificidos (Annelida: Oligochaeta, Tubificidae). Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Ciencias Biológicas. Departamento de Ecología.
- SANTOS, E. y VILLANUEVA, J.R. (1985). El cáncer. Prensa científica. Barcelona. pp. 5-9.
- SCHLEGELMICH, R.; KRUG, A. & WOLF, H. U. (1988) Mutagenic activity of acetonitrile and fumaronitrile in three short term assays with special reference to autoinduction. *J. Appl. Toxicol.*, **8**:201-209.
- SHAHIN, M.M. (1987). Relationships between structure and activity of environmental chemicals. *Mutat. Res.*, **181**, 243-256.
- SINGER, P. C; J. J. BARRY; G. M. PALEN & A. E. SCRIVNER (1981) Trihalomethane formation in North Carolina drinking waters. *J. AWWA* **73** (8): 392-401.
- SNYDER, L.R. (1974) *J. Chromatograf.*, **92**: 223
- STAHL, S.JR. (1991). The genetic Toxicology of Organic Compounds in Natural Waters and Wastewaters. *Ecotoxicol. Environ. saf.*, **22**,94-125.
- STUMM, W. & MORGAN J.J.; (1981). Some concepts on water pollution and its control: An ecological perspective. En: *Aquatic chemistry*. John Wiley y Sons, New York. 780 págs.

- SUZUKI, J.; SATO, T.; ITO, A. & SUZUKI, S. (1990). Mutagen formation and nitration by exposure of phenylphenols to sunlight in water containing nitrate or nitrite ion. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*; **45**: 516-522.
- TAYLOR, S.T. (1982). Mutagenesis vs carcinogenesis. *Food Technol.*, march 1982, 65-102.
- TAYLOR, A.W. & KILMER, V.J. (1980). Agricultural phosphorus in the environment. En: *The role of phosphorous in agriculture*. Khasawneh, F.E.; Sample, E.C. & Kanparth, E.J. (Eds). American Society of Agronomy, Madison, Wisc. págs: 545-557.
- TEDESCHI, S. (1985). Recycling and re-use of industrial wastewater in the Mediterranean area. *Environmental Health*. **8**: 49-72.
- TENNANT, R.W. & ASHBY, J. (1991). Classification according to chemical structure, mutagenicity to *Salmonella* and level of carcinogenicity of a further 39 chemicals tested for carcinogenicity by the U.S. National Toxicology Program. *Mutat. Res.* **257**: 209-227.
- THIBODEAUX, L. J. (1979) *Chemodynamic, Environmental Movement of Chemicals in Air, Water and Soil*. John Wiley and sons, Inc., New York.
- TIKKANEN, L. & KRONBERG, L. (1990). Genotoxic effects of various chlorinated butenoic acids identified in chlorinated drinking water. *Mutat. Res.*, **240**: 109-116.
- URANO, K.; HAGA, N.; EMOTO, F. & SHINOME T. (1988a). Method for evaluating mutagenicity of water I. A new method of preparing samples for mutagenicity test. *Sci. Total Environ.*, **74**: 177-189.
- URANO, K.; HAGA, N. & EMOTO, F. (1988b). Method for evaluating mutagenicity of water. II. Conditions for applying new sample preparation method to the Ames test. *Sci. Total Environ.*, **74**: 191-198.
- VACA, C.E. & HARMS-RINGDAH, M. (1986) Lipid peroxidation in the rat-liver S) fraction: Influence of membrane lipid composition. *Mutat. Res.* **162**: 21-32.
- VARMA, M.M.; AMPY, F.R.; VERMA, K. & TALBOT, W.W. (1988). In vitro Mutagenicity of Water Contaminants in Complex Mixtures. *J. Appl. Toxicol.*, **8**, (4), 243-248.
- VEENSTRA, J. N. & SCHNOOR, J. L. (1980) Seasonal variations in trihalomethane levels in an Iowa River water supply. *J. AWWA*, **72**(10): 583-590.
- VELAZQUEZ, A. (1987). Valoración del potencial genotóxico de varios insecticidas organofosforados en *Drosophila melanogaster*. (Tesis Doctoral). Universidad Autónoma de Barcelona.
- VENITT, S. & PARRY, J.M. (Eds) (1984). *Mutagenicity Testing. A Practical Approach*. IRL Press Ltd., Oxford.

- WANG, W.H. & LAY, J.P. (1989). Fate and effects of salicylic acid compounds in freshwater systems. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **17**: 308-316.
- WANGERSKY, P.J. (1986). Biological control of trace metal residence time and speciation - a review and synthesis. *Marine Chem.*, **18** (2-4): 269-297.
- WATERS, L.C.; SCHENLEY, R.L.; OWEN, B.A.; WALSH, P.J.; HSIE, A.W.; JOLLEY, R.L.; BUCHANAN, M.V. & CONDIE, L.W. (1989). Biotesting of wastewater: a comparative study using the Salmonella and CHO assay systems. *Env. Mol. Mut.*, **14**: 254-263.
- WETZEL, R. G. (1983) *Limnology*, 2nd ed. New York: Saunders College Publishing.
- WILLIAMS, G. M. & WEISBURGER, J.H. (1988). Application of a cellular test battery in the decision point approach to carcinogen identification. *Mutat. Res.*, **205**: 79-90.
- WILLIAMSON, S.J. (1981) Epidemiological studies on cancer and organic compounds in Us drinking waters. *Sci. Total Environ.*, **18**, 187-203.
- WINNER, R.W. (1984). The toxicity and bioaccumulation of cadmium and copper as affected by humic acid. *Aquatic Toxicol.*, **5**: 267-274.
- WINNER, R.W. (1985). Bioaccumulation and toxicity of copper as affected by interactions between humic acid and water hardness. *Water Res.*, **19** (4): 449-455.
- WINNER, R.W. (1986). Interactive effects of water hardness and humic acid on the chronic toxicity of cadmium to *Daphnia pulex*. *Aquatic Toxicol.*, **8** (4): 281-294.
- WOLKOFF, A.W. & CREED, C. (1981). Use of Set-pak C18 cartridges for the collection & concentration of environmental samples. *J. Liquid Chromatography*, **4** (8): 1459-1472.
- WOOD, J.M. (1987). Biological processes involved in the cycling of elements between soil or sediments and the aqueous environment. *Hydrobiologia*, **149**: 31-42.
- WOOD, J.M. (1989). Transport, bioaccumulation and toxicity of elements in microorganism under environmental stress. En: *Proc. Int. Conf. Heavy Metals in the environment*, Geneva, P. Vernet (Ed), CEP Consultants Ltd, Edinburgh, UK, págs: 1-12.
- YUNIS, J.J. (1983). The chromosomal basis of human neoplasie. *Science*, **221**: 227-236.

IX- APÉNDICE

CEPA TA1535

CEPA TA1538

		ENSAYO 1						ENSAYO 2					
		1º FR.		2º FR.		3º FR.		1º FR.		2º FR.		3º FR.	
MES		-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9
Jn	M	14,33	21,67		40,33	8,333	25,67	22	13	11	19,33	13	10,67
	D.T	3,3	14,5	T	3,09	1,7	1,7	6,72	2,45	1,63	2,05	2,16	1,89
	I.M	1,34	2,1		3,9	0,78	2,48	1,44	1,08	0,72	1,61	0,85	0,89
Jl	M	18	29,33	18	23,33	11,33	37	19,67	21,67	20,67	16,67	11,67	29
	D.T	3,74	6,94	0,82	1,7	0,94	3,74	3,09	4,99	1,25	4,11	1,7	3,27
	I.M	1,32	1,19	1,32	0,95	0,83	1,5	1,34	1,14	1,41	0,88	0,8	1,53
Ag	M	15,67	12,67			15	13,33	25	18	11,33	23,67	19,67	17,33
	D.T	2,05	2,05	T	T	3,74	5,44	6,48	2,16	0,94	1,89	3,66	3,3
	I.M	1,57	1,09			1,5	1,14	1,7	1,02	0,77	1,34	1,34	0,98
S	M	17	18,67	24	15,33	15,33	20,33	20,33	12,33	18	13	19,33	16
	D.T	0,82	3,4	0,82	2,36	2,49	1,89	1,25	1,25	1,41	2,45	1,25	1,63
	I.M	0,96	0,89	1,36	0,73	0,87	0,97	0,88	0,88	0,78	0,91	0,84	1,12
O	M	15	15,33	18,33	18,67	14,67	12,33	21	20,33	24	20,67	17,33	19
	D.T	4,08	2,05	6,18	4,19	3,4	2,49	2,16	2,05	3,74	3,4	1,25	4,97
	I.M	1	1,15	1,22	1,4	0,98	0,93	1,07	0,97	1,22	0,98	0,88	0,9
N	M	13,33	12,33	10	14,67	14	17,67	22	12,33	21	14,67	22,67	14,33
	D.T	3,4	3,09	1,41	3,86	2,83	2,49	3,27	2,87	1,63	3,68	2,62	1,7
	I.M	1,21	0,97	0,91	1,16	1,27	1,39	0,89	1	0,94	1,19	1,02	1,16
D	M	21,67	10,33	34,33	9,333	15,67	10	13	12,33	19,67	16,67	14	15,33
	D.T	2,87	1,25	2,49	2,36	6,34	0	2,45	2,05	1,25	0,94	2,16	1,89
	I.M	0,79	1,03	1,26	0,93	0,57	1	0,87	0,88	1,31	1,16	0,93	1,07
E	M	10	15,33	8,667	14,33	12	14,33	22,67	18,67	15	23	26,67	18,33
	D.T	0,82	4,5	1,25	2,05	4,32	3,4	4,78	5,91	4,32	2,94	1,25	3,4
	I.M	1,07	1,24	0,93	1,16	1,29	1,16	1,06	1,04	0,71	1,28	1,27	1,02
F	M	12,33	11	20,33	20,33	12	21	14	14	14	15,33	12,33	19
	D.T	1,25	0,82	0,47	2,87	1,63	5,56	1,41	4,55	5,89	4,11	4,64	2,45
	I.M	0,84	0,54	1,39	1	0,82	1,03	0,78	0,78	0,78	0,85	0,69	1,06
Mz	M	16,67	6,667	16,33	14	17,33	8	15,67	17,33	19,67	27	16	15,67
	D.T	6,8	2,05	5,44	2,16	1,7	2,16	2,49	5,56	6,34	6,53	2,16	2,49
	I.M	1,04	0,74	1,02	1,56	1,08	0,89	0,82	0,95	1,16	1,47	0,94	0,85
Ab	M	51,33	10,33	35	10	31	9,667	15,67	13,67	12	13,33	16,33	13
	D.T	10,7	2,62	4,24	2,16	5,89	1,7	2,62	2,62	2,94	3,68	1,25	1,63
	I.M	3,26	1,35	2,23	1,3	1,98	1,26	1,09	1,17	0,84	1,14	1,14	1,11
My	M	17,33	16,67	13,33	14,67	37,67	8	13,33	11,33	12	11,67	16,67	7
	D.T	2,49	1,7	1,7	2,36	4,19	1,41	3,3	2,62	2,94	1,89	3,3	1,63
	I.M	1,24	1,16	0,95	1,02	2,69	0,56	1,18	1,13	1,06	1,17	1,47	0,7

		CEPA TA98						CEPA TA100					
		1º FR.		2º FR.		3º FR.		1º FR.		2º FR.		3º FR.	
MES		-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9
Jn	M	20	30	21,33	25,67	11,33	47	19	35,33	13	30,67	12	51,33
	D.T	0	11,4	5,91	9,39	0,47	3,74	2,45	4,5	0,82	4,11	2,16	3,3
	I.M	1,2	0,92	1,20	0,79	0,68	1,44	1,02	0,95	0,7	0,83	0,64	1,39
Jl	M	34,33	42,67	23,67	40	12,33	47	33,67	40,67	25,33	40,33	16,67	43,67
	D.T	6,94	6,6	4,19	3,74	2,05	6,98	3,68	5,73	4,5	1,7	4,11	2,05
	I.M	1,61	1,17	1,11	1,1	0,58	1,29	1,56	1,15	1,19	1,14	0,78	1,24
Ag	M	27,67	42	18	29	26,67	22,33	37,67	52,67	32	38,33	36,33	48
	D.T	3,86	12,4	2,45	3,27	4,11	5,31	3,09	5,31	3,27	4,5	2,62	3,74
	I.M	1,54	1,7	1	1,18	1,48	0,91	1,45	1,65	1,23	1,2	1,4	1,5
S	M	25,33	24,33	19,33	22,67	21,67	26,33	21	27,67	30,33	26,33	19	29,67
	D.T	4,99	0,94	4,71	4,5	2,49	4,19	0,82	4,19	4,03	4,99	1,63	2,05
	I.M	1,27	1,35	0,97	1,26	1,08	1,46	1,29	1,26	1,86	1,2	1,16	1,35
O	M	15,67	18,67	34	15,33	20	25,67	23,33	40,67	21,33	40,67	22,33	21
	D.T	3,86	3,4	4,08	2,36	2,16	4,92	4,78	6,55	3,09	2,49	2,87	2,94
	I.M	0,85	0,8	1,85	0,66	1,09	1,1	1,06	1,85	0,97	1,85	1,02	0,95
N	M	25,67	36,33	34	26,67	26	34,33	24,33	33	30,33	27,33	21,33	29,67
	D.T	2,49	1,25	3,74	9,29	1,63	6,6	2,62	4,9	2,87	3,86	2,62	1,7
	I.M	1,03	1,63	1,38	1,19	1,04	1,54	1,16	1,32	1,44	1,09	1,02	1,19
D	M	28	34,33	26	40,67	32,33	23	21,33	39	21	43,33	23,33	36
	D.T	2,16	7,32	6,35	9,46	3,09	6,48	6,18	2,16	2,16	5,44	4,19	2,16
	I.M	1,08	1,06	1	1,26	1,24	0,71	1,07	0,96	1,05	1,07	1,17	0,89
E	M	21,33	23,33	17,67	23,67	15,33	24,67	14,67	41	14,67	38,67	13,33	36,33
	D.T	4,5	6,94	0,47	4,64	2,49	4,64	1,25	2,16	1,25	3,86	1,25	6,6
	I.M	1,25	0,93	1,04	0,95	0,9	0,99	1	1,06	1	1	0,91	0,94
F	M	96,33	27	85,67	20,33	20	23,67	17	44,67	18,67	37,33	17	46
	D.T	2,05	2,94	11,7	1,7	2,16	2,87	2,94	2,05	3,4	5,31	1,63	1,63
	I.M	5,56	1,11	4,94	0,84	1,15	0,97	1,24	1,05	1,37	0,87	1,24	1,05
Mz	M	29	31,67	27,67	32	25	27,33	24,67	34	24,33	35,67	22	30
	D.T	5,72	0,47	1,7	1,41	4,9	7,93	4,5	6,98	3,3	2,49	2,94	4,32
	I.M	1,32	1,3	1,26	1,22	1,14	1,04	1,37	1,1	1,35	1,15	1,22	0,97
Ab	M	58	40	40	48	36,67	33,67	54,67	26,67	58,67	37	47,67	33
	D.T	6,16	4,9	2,94	4,08	7,36	8,18	7,04	8,18	3,3	6,16	6,24	4,08
	I.M	2,81	1,29	1,94	1,55	1,77	1,09	1,71	1,03	1,83	1,42	1,49	1,27
My	M	24	51,33	28,33	35,33	20,33	38,33	20,33	40,33	27,33	29	27	29
	D.T	2,16	16,4	3,3	6,18	2,05	9,74	2,49	4,5	5,73	2,45	2,45	2,16
	I.M	1,06	1,6	1,25	1,1	0,9	1,2	1,25	1,55	1,21	1,12	1,19	1,12

		CEPA TA100						CEPA TA100					
		1º FR.		2º FR.		3º FR.		1º FR.		2º FR.		3º FR.	
MES		-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9
Jn	M	99,33	106,7	82	91	134,7	99,33	89,67	135,3	73,67	117,3	116,7	122
	D.T	8,26	9,43	2,45	8,04	8,18	11,4	9,81	4,99	7,85	10,5	6,24	7,48
	I.M	1,07	1,16	0,88	0,98	1,45	1,07	1,09	1,15	0,89	1,01	1,42	1,05
Jl	M	91	168,7	122,3	176	130,3	121,7	94,33	126	123	129,3	137,3	110
	D.T	4,55	4,99	9,53	6,68	4,11	7,72	9,29	4,97	8,83	7,41	16	13,9
	I.M	0,96	1,02	1,29	1,06	1,37	0,74	0,92	0,91	1,19	0,94	1,33	0,8
Ag	M	108	115,3	87	98,33	107,7	122,7	107,3	149,7	116,7	120	136,7	110,7
	D.T	14	8,73	5,72	13,6	7,13	1,25	6,02	15,2	3,3	5,72	4,99	12,1
	I.M	1,14	1,04										

CEPA TA1635														CEPA TA1538													
ENSAYO 1														ENSAYO 2													
MES		1ª FR.		2ª FR.		3ª FR.		1ª FR.		2ª FR.		3ª FR.			1ª FR.		2ª FR.		3ª FR.			1ª FR.		2ª FR.		3ª FR.	
		-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9		-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9		-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9
Jn	M	11,33	11,67	20,33	16,67	9	20,67	16	13	26,67	18,33	15	10		13	17,33	7,333	23	12,33	15		19	20	13	26,67	17	20
	D.T	6,85	0,94	2,87	1,7	3,27	2,62	2,94	1,63	3,3	2,49	2,16	1,63		2,46	2,49	0,94	2,94	2,49	2,45		2,45	2,16	2,16	3,3	2,94	4,08
	I.M	1,06	1,13	1,91	1,61	0,84	2	1,04	1,08	1,74	1,53	0,98	0,83		1,26	1,11	0,71	1,47	1,19	0,96		1,3	1,05	0,89	1,4	1,16	1,05
Jl	M	26,67	19,67	11,33	28,67	28,33	42	20	15,67	12,67	20,67	29	31,33		30,33	49	9,333	34,67	10,33	30,33		50,33	37,33	24	34,33	28,67	27,33
	D.T	3,3	2,62	2,05	5,31	2,05	3,74	3,27	2,05	2,62	1,25	2,45	3,4		2,36	11	0,47	4,92	1,7	4,03		5,56	8,96	2,16	7,36	3,77	6,34
	I.M	1,95	0,8	0,83	1,16	2,07	1,7	1,38	0,82	0,86	1,09	1,98	1,65		3,64	2,3	1,12	1,63	1,24	1,42		2,1	1,72	1	1,58	1,19	1,26
Ag	M	8,667	14			19,33	12,67	13,33	21	11,33	17,67	24,67	19,33		10,67	26,33	6	23	10	20,33		23,33	29,67	19,67	22	24,67	22,67
	D.T	1,25	2,16	T	T	3,33	2,36	4,99	4,97	1,7	3,09	2,87	2,05		8,99	3,3	0,82	3,56	2,16	3,4		2,87	1,7	1,25	1,63	1,25	2,87
	I.M	0,87	1,2			1,93	1,09	0,91	1,19	0,77	1	1,68	1,09		1,52	1,14	0,86	1	1,43	0,88		1,49	1,13	1,25	0,84	1,57	0,86
S	M	25,33	13,67	18,33	15,67	18,67	27,33	21,33	14	37	12,67	26,67	17		33,33	26	20	20,33	11,33	16		32	40	28,67	28,33	14	17
	D.T	4,19	1,7	3,68	2,87	1,7	1,25	4,92	2,16	11,6	1,25	1,25	0,82		4,78	2,16	2,45	2,05	4,11	8,83		4,97	3,74	3,68	1,25	2,83	1,63
	I.M	1,43	0,65	1,04	0,75	1,06	1,3	0,93	0,98	1,61	0,88	1,16	1,19		2,22	2,05	1,33	1,6	0,76	1,26		1,08	2	1,69	1,42	0,82	0,85
O	M	13,33	16,67	12	14	28,67	13,67	21,67	18,67	16,33	13,33	22,67	18		27,33	26,67	31,67	25,67	23,33	17		20,33	15,33	12,33	14	15,33	16
	D.T	7,13	1,25	0,82	2,94	3,4	3,3	2,05	0,94	5,56	2,05	2,62	2,16		5,44	6,02	4,5	2,49	2,05	2,16		3,09	2,05	1,25	1,63	2,05	1,63
	I.M	0,89	1,18	0,8	1,05	1,91	1,03	1,1	0,89	0,83	0,63	1,15	0,86		1,11	1,48	1,28	1,33	0,95	0,94		1,2	1,21	0,73	1,1	0,9	1,26
N	M	11,67	13	11,67	17,67	10,67	10,33	21,33	13,67	23	13,33	19,33	12,33		28,33	38,67	20,33	25,67	22,67	24,67		26,67	28,67	21	24,33	21,67	19,33
	D.T	3,77	1,41	2,05	2,49	0,94	1,7	3,3	3,4	2,16	2,49	1,25	1,7		1,25	2,87	1,25	1,7	2,62	3,86		1,7	2,87	3,74	1,7	2,87	3,4
	I.M	1,06	1,03	1,06	1,39	0,97	0,82	0,96	1,11	1,03	1,06	0,87	1		1,25	1,59	0,9	1,05	1	1,01		1,21	1,43	0,95	1,22	0,98	0,97
D	M	22,33	14	18,67	11	21,33	11,67	13,67	16,67	14	14,33	14,67	12,33		39	34,67	29,67	68,33	29,33	47,33		18,33	24,33	17	37	17	40
	D.T	2,05	3,27	2,49	0,82	2,05	0,47	1,89	1,7	2,94	3,68	3,68	2,49		4,32	5,56	8,38	3,68	5,44	6,34		2,87	17,6	5,89	4,55	2,16	4,55
	I.M	0,82	1,4	0,68	1,1	0,78	1,17	0,91	1,16	0,93	1	0,98	0,86		1,23	0,91	0,94	1,8	0,93	1,28		1,25	0,81	1,16	1,23	1,16	1,33
E	M	15,67	13	14	16,33	13	12,33	27,33	18	28,67	21	28,33	19,33		13,67	22,33	17,33	20	14,33	24,33		13,33	24	19,33	19	18	18
	D.T	4,71	1,63	1,41	3,68	2,16	0,47	2,05	1,63	2,05	3,74	1,25	1,25		2,05	0,47	0,47	5,89	2,49	1,7		3,3	4,9	2,87	4,55	3,27	0,82
	I.M	1,68	1,05	1,5	1,32	1,39	1	1,3	1	1,37	1,17	1,35	1,07		1,03	1,37	1,3	1,22	1,08	1,49		0,82	1,18	1,18	0,93	1,1	1,26
F	M	18,67	15	18	15	18,67		22	12	20,67	12,33	19,67	15,33		16	44,67	28	49,33	19,67	34		16,33	41,67	18	52	15	27,67
	D.T	4,03	0,82	4,32	3,56	2,45	3,3	2,94	4,24	1,7	2,05	4,03	1,25		2,16	4,5	9,42	4,78	5,25	3,74		2,49	7,04	2,16	4,97	2,45	6,02
	I.M	1,27	0,74	2,45	0,74	1,02	0,92	1,22	0,67	1,15	0,69	1,09	0,85		0,92	1,2	1,62	1,32	1,13	0,91		1,18	1,32	1,32	1,64	1,1	0,87
Mz	M	15,33	8,667	24,67	8	26	12	13	16,33	10	19,33	23,33	22		21,33	32,67	21	25,33	13,33	24,33		22	35,67	18,67	39	16,33	34
	D.T	2,05	0,94	4,99	2,16	3,56	2,94	2,45	2,62	2,94	2,49	3,86	5,35		3,4	10,4	2,16	1,25	2,05	3,3		3,74	5,31	4,5	4,55	2,49	5,35
	I.M	0,96	0,96	1,54	0,89	1,63	1,33	0,76	0,89	0,69	1,05	1,37	1,2		1,31	1,27	1,29	0,99	0,82	0,95		1,29	0,99	1,1	1,08	0,96	0,94
Ab	M	12,33	6	18,67	6,333	14	8,333	16,33	10,33	16,67	11,67	13	11,33		21	21,33	23	23	16,33	22,33		32,33	28	39,33	29,33	27,67	31,33
	D.T	2,87	1,41	2,05	1,25	2,16	2,49	4,64	4,78	3,86	2,05	2,16	2,87		4,55	5,31	4,08	2,45	4,03	3,68		3,4	2,94	3,68	4,11	3,3	3,3
	I.M	0,79	0,78	1,19	0,83	0,89	1,09	1,14	0,89	1,16	1	0,91	0,97		1,24	1,08	1,35	1,17	0,95	1,14		1,14	0,95	1,39	1	0,98	1,07
My	M	13,67	13,67	15,67	7,333	16,33	12,67	11	8	14,33	14,33	13,33	14,33		30	42,67	17	33,33	14,67	37		32,33	62,67	21,67	42,33	17,33	53,67
	D.T	2,62	2,62	3,86	0,47	2,05	1,7	2,94	1,63	1,7	3,3	3,4	3,3		4,55	3,68	1,63	3,4	1,7	3,27		3,09	7,36	1,25	4,5	2,05	13,9
	I.M	0,96	0,96	1,12	0,51	1,17	1,27	0,97	0,8	1,27	1,43	1,18	1,43		2,25	1,75	1,28	1,37	1,1	1,52		2,11	1,86	1,41	1,26	1,13	1,59

CEPA TA98														CEPA TA100													
MES		1ª FR.		2ª FR.		3ª FR.		1ª FR.		2ª FR.		3ª FR.			1ª FR.		2ª FR.		3ª FR.			1ª FR.		2ª FR.		3ª FR.	
		-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9		-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9		-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9
Jn	M	26,33	54,67	20,67	37	9,667	42	27,67	59,67	20	37,33	12	45		91,67	93	88	103	129	147,7		77	105,3	83,33	121	113,3	170,3
	D.T	2,49	2,62	1,25	3,56	0,47	2,45	1,7	6,55	3,56	3,4	1,63	4,9		13,3	5,35	4,55	5,53	4,97	8,58		3,27	14,7	9,81	13	4,19	5,56
	I.M	1,56	1,87	1,24	1,13	0,58	1,29	1,48	1,61	1,07	1,01	0,64	1,22		0,99	1	0,95	1,11	1,39	1,59		0,94	0,9	1,01	1,04	1,38	1,46
Jl	M	49,33	34	25,67	45	13,67	36,67	36,67	32,33	23,67	43,33	16,67	34,67		98	154	91	200,3	72	226,3		88,67	117,7	89	164,3	95,67	177
	D.T	4,19	3,56	5,25	3,27	1,7	1,25	1,7	2,87	2,49	2,05																

CEPA TA1535

		ENSAYO 1						ENSAYO 2					
MES		1ª FR.		2ª FR.		3ª FR.		1ª FR.		2ª FR.		3ª FR.	
		-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9
Jn	M	12,67	14	23,33	12,33	10,67	12,67	18,33	15,33	11,67	14	14	15,67
	D.T	4,99	3,27	3,3	2,05	3,09	1,89	1,25	4,5	2,05	2,45	2,94	1,7
	I.M	1,19	1,36	2,19	1,19	1	1,23	1,2	1,28	0,76	1,17	0,91	1,31
Jl	M	15,67	34,67	18	24	16	27,33	17	26,67	19,67	17,67	17	20,33
	D.T	5,44	5,79	2,45	3,27	1,63	4,19	0,82	2,49	2,05	3,06	2,94	1,25
	I.M	1,15	1,41	1,32	0,97	1,17	1,11	1,18	1,4	1,34	0,93	1,16	1,07
Ag	M	11,33	11			7,333	14,33	18,67	17,33		21,33	12,67	22
	D.T	1,25	1,41	T	T	1,25	4,11	5,73	2,05	T	3,4	2,05	2,45
	I.M	1,13	0,7			0,73	0,91	1,27	0,98		1,21	0,86	1,25
S	M	10,33	14	18,33	18,67	27	16	15,67	12,33	20,33	15,33	29,33	15
	D.T	3,4	2,94	5,25	2,49	0,82	0,82	1,7	1,25	1,25	1,7	2,05	2,16
	I.M	0,58	0,67	1,04	0,89	1,53	0,76	0,88	0,88	0,88	1,07	1,28	1,05
O	M	17	16,33	13,67	12,33	16,33	14,33	20,33	22	19,67	15,67	22,33	23,67
	D.T	7,79	3,86	0,94	0,94	2,05	3,4	1,7	2,45	3,3	2,49	4,99	1,7
	I.M	1,13	1,23	0,91	0,93	1,09	1,08	1,03	1,05	1	0,75	1,14	1,13
N	M	9,667	16,33	12,67	15	11,33	20,67	24,67	12,67	22	12,67	23,67	15
	D.T	1,7	6,8	1,7	3,56	1,25	3,3	12,4	4,92	1,63	2,87	4,03	1,63
	I.M	0,88	1,29	1,15	1,18	1,03	1,63	1,1	1,03	0,99	1,03	1,06	1,22
D	M	22,67	11	21	11,67	20,33	8,333	13,33	16,33	13,67	15,33	11,33	9,333
	D.T	0,47	3,74	4,9	1,25	3,77	2,05	2,05	1,7	2,87	4,5	2,05	1,26
	I.M	0,83	1,1	0,77	1,17	0,74	0,83	0,89	1,14	0,91	1,07	0,76	0,66
E	M	9	20,67	8,667	17	11	19,33	17,33	23	17	22	23,67	22
	D.T	1,63	1,25	2,49	2,16	2,16	4,64	3,4	1,63	2,45	4,97	1,7	3,74
	I.M	0,96	1,68	0,93	1,38	1,18	1,57	0,93	1,28	0,81	1,22	1,13	1,22
F	M	13,33	13,67	17	12,33	13	17,33	19	8	18	7,667	16,33	15,33
	D.T	2,49	1,25	3,74	2,62	2,94	3,3	1,63	1,63	2,16	0,47	2,05	1,25
	I.M	0,91	0,67	1,16	0,61	0,89	0,85	1,06	0,44	1	0,43	0,91	0,85
Mz	M	10,33	13	14,33	11	20,33	9,667	12,33	22,33	17	20,33	20,33	17
	D.T	1,25	3,56	1,89	0,82	1,7	1,7	2,49	3,3	2,94	3,4	5,44	5,35
	I.M	0,85	1,44	0,9	1,22	1,27	1,07	0,73	1,22	1	1,11	1,2	0,93
Ab	M	21,33	11,33	17	10,67	15,67	11,33	18	12	16,67	16	17	6
	D.T	6,55	2,62	1,63	4,11	2,62	1,89	3,27	2,45	2,05	2,45	6,16	1,41
	I.M	1,36	1,48	1,08	1,39	1	1,48	1,28	1,03	1,16	1,37	1,19	0,51
My	M	20,67	12,67	13	12,67	13	16	14,67	9	11,33	9,667	11	12
	D.T	3,4	1,25	2,16	4,99	2,16	2,94	1,7	2,45	3,3	3,09	1,63	4,55
	I.M	1,48	0,88	0,93	0,88	0,93	1,12	1,29	0,9	1	0,97	0,97	1,2

CEPA TA1538

		ENSAYO 1						ENSAYO 2					
MES		1ª FR.		2ª FR.		3ª FR.		1ª FR.		2ª FR.		3ª FR.	
		-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9
Jn	M	8	12	10,67	22,67	10,33	9,333	11,67	11	16,67	27,33	13	13,33
	D.T	1,41	2,16	2,05	3,68	1,89	1,25	2,05	2,16	3,3	5,25	2,16	1,25
	I.M	0,77	0,77	1,03	1,45	1	0,6	0,8	0,58	1,14	1,44	0,89	0,7
Jl	M	23	32	9	10,67	8	22,67	50,67	30,33	23,33	32	25,67	22
	D.T	2,16	1,41	0,82	4,11	0,82	3,68	1,25	4,78	7,36	6,68	9,53	6,16
	I.M	2,76	1,5	1,08	0,5	0,96	1,06	2,11	1,4	0,97	1,48	1,07	1,02
Ag	M	11	27		24,67	10,33	24,33	24,33	33,33	7,333	26	19,67	29
	D.T	2,49	3,27	T	2,49	2,36	3,3	11,1	4,5	2,05	1,63	4,11	3,74
	I.M	1,57	1,17		1,07	1,48	1,06	1,55	1,27	0,47	0,99	1,26	1,1
S	M	20,33	25,33	13,67	22	13,67	19	20,67	31,33	18,33	28,33	21,67	24,33
	D.T	5,31	5,31	2,87	4,32	2,49	4,32	4,19	2,87	4,5	2,05	3,09	5,44
	I.M	1,36	2	0,91	1,74	0,91	1,5	1,22	1,57	1,06	1,42	1,27	1,22
O	M	47,33	20	40,33	23,67	21,33	18	26	14,33	20,67	14,33	20	13
	D.T	4,64	4,08	4,5	2,62	2,87	3,27	4,9	1,25	2,49	4,5	2,94	2,16
	I.M	1,92	1,11	1,63	1,31	0,86	1	1,63	1,13	1,22	1,13	1,18	1,03
N	M	34,67	27,33	23	28,67	25,67	18	27,67	20,33	22,33	23,33	21,33	19
	D.T	4,19	8,65	2,94	2,87	0,94	5,66	2,49	3,68	2,49	3,68	2,87	2,94
	I.M	1,53	1,12	1,01	1,18	1,13	0,74	1,26	1,02	1,02	1,17	0,97	0,95
D	M	30	43,67	35,33	42,33	35	49	15,33	30	18,67	30	16,67	31
	D.T	2,83	2,49	6,6	12,3	3,56	4,32	1,25	2,94	2,49	4,55	2,05	6,48
	I.M	0,95	1,15	1,12	1,11	1,11	1,29	1,05	1	1,27	1	1,14	1,03
E	M	21,67	18	16,33	15,33	13,33	13,67	22,33	18	19	17	16	15
	D.T	8,18	7,79	3,3	5,31	2,49	1,7	2,87	2,94	4,32	4,55	3,56	3,74
	I.M	1,63	1,1	1,23	0,94	1	0,94	1,37	1,26	1,16	1,19	0,98	1,05
F	M	17,33	40,67	16,67	46,33	21	39,67	15,33	35	15,67	50,33	17,67	38
	D.T	3,3	4,92	1,7	2,49	2,94	3,86	2,05	8,38	3,09	2,05	1,7	2,94
	I.M	1	1,09	0,96	1,24	1,21	1,06	1,12	1,11	1,15	1,59	1,29	1,2
Mz	M	28,67	25,33	19,33	24,33	18	19,33	27,33	33,67	19,33	36,33	17	30,67
	D.T	3,68	3,4	2,49	3,3	2,94	7,13	3,3	5,31	4,5	4,92	1,63	6,02
	I.M	1,76	0,99	1,18	0,95	1,1	0,75	1,61	0,94	1,14	1,01	1	0,85
Ab	M	20,67	26,33	14,33	23,33	19,33	20,67	31,33	30,33	20	27	25,67	34,67
	D.T	2,49	2,05	3,68	3,68	2,05	3,3	2,49	4,78	2,94	6,16	3,86	4,92
	I.M	1,22	1,34	0,84	1,19	1,14	1,05	1,11	1,03	0,71	0,92	0,91	1,18
My	M	16,67	35,33	14,67	31,33	17,67	31,33	18,33	51,67	16,33	44	20	44
	D.T	0,94	6,02	3,68	4,64	2,49	4,78	2,49	8,73	1,7	2,16	2,94	3,74
	I.M	1,25	1,45	1,1	1,29	1,33	1,29	1,2	1,53	1,07	1,31	1,3	1,31

CEPA TA98

Jr	M	15	50,67	18,67	37,67	12	37	17,67	53,33	19	40,33	13,67	41,33
		D.T	2,16	3,09	3,09	5,44	0,82	7,48	1,7	5,73	2,94	3,3	1,25
Jl	I.M	0,9	1,55	1,12	1,15	0,72	1,13	0,95	1,44	1,02	1,09	0,73	1,12
	M	38,67	34,33	16,67	18,33	13,33	29,67	31	32,67	18	25	16,67	33
	D.T	1,7	3,3	1,25	2,49	2,06	1,7	2,94	1,89	5,89	2,94	4,03	2,45
Ag	I.M	1,81	0,95	0,78	0,5	0,63	0,82	1,45	0,92	0,84	0,71	0,78	0,93
	M	18,33	27,67	16,33	32,67	13,67	17	32,33	35,67	31	38,33	25	33,33
	D.T	2,05	3,3	0,47	4,11	1,25	1,41	4,19	2,62	1,63	8,18	4,97	3,3
S	I.M	1,02	1,12	0,91	1,32	0,76	0,69	1,24	1,11	1,19	1,2	0,96	1,04
	M	17,33	27	17,33	25,33	18,67	29	16	26	17,33	23,67	17	26,33
	D.T	0,47	2,83	0,94	3,09	2,87	2,94	1,41	2,94	1,7	3,4	2,5	2,49
O	I.M	0,67	1,5	0,67	1,41	0,93	1,61	0,98	1,18	1,06	1,08	1,2	1,2
	M	29,67	29,33	15,33	34,5	20,33	20,67	31,33	26,67	22,67	31,67	23	26
	D.T	6,13	6,02	2,49	0,5	4,19	2,87	4,5	4,99	2,87	2,87	5,1	5,89
N	I.M	1,62	1,26	0,84	1,46	1,11	0,89	1,42	1,21	1,03	1,44	1,05	1,18
	M	25,33	29	32,67	24,67	22	28,67	17,67	28	24	25	21,67	26,33
	D.T	3,86	2,83	3,69	3,68	5,35	5,91	2,87	2,16	3,27	7,12	2,87	3,3
D	I.M	1,01	1,3	1,31	1,1	0,88	1,28	0,84	1,12	1,14	1	1,03	1,05
	M	22	37	27,33	34	22,33	30,67	18,67	39,67	21,67	43,33	19	36,67
	D.T	2,16	1,63	4,11	4,55	3,86	6,13	2,87	4,64	4,5	6,24	0,82	7,41
E	I.M	0,85	1,14	1,05	1,05	0,86	0,95	0,93	0,98	1,08	1,07	0,95	0,9
	M	16	29,33	22,67	21,67	15,33	24	17,33	39,67	16	39	15	35,67
	D.T	2,94	2,05	1,7	5,79	2,87	3,56	2,05	5,91	2,16	2,94	1,63	5,73
F	I.M	0,94	1,17	1,33	0,87	0,9	0,96	1,18	1,03	1,09	1,01	1,02	0,92
	M	21,33	37,67	21,67	38	25,33	26,33	16,67	51	17,33	55,67	18,33	43,67
	D.T	5,31	4,92	2,62	2,16	2,49	4,19	1,89	2,16	2,49	4,78	4,11	4,11
Mz	I.M	1,23	1,55	1,25	1,55	1,46	1,08	1,22	1,2	1,27	1,3	1,34	1,02
	M	26,67	28	21	26,33	18,67	34,33	23,67	33,67	21,67	31,33	18,33	37
	D.T	1,7	1,41	3,74	7,59	3,86	6,24	2,62	4,5	3,68	4,03	3,68	4,08
Ab	I.M	1,21	1,06	0,95	1	0,85	1,3	1,31	1,09	1,2	1,01	1,02	1,19
	M	25,33	37,67	34	37	19,67	37,33	40,67	34,67	50	42,67	38,33	35,33
	D.T	2,05	7,41	2,94	3,74	3,68	6,55	4,92	4,11	6,98	1,25	7,04	3,68
My	I.M	1,23	1,22	1,64	1,19	0,95	1,2	1,27	1,33	1,56	1,64	1,2	1,4
	M	29,33	34,33	23,67	31,33	23	34,67	21,33	28	26,67	27,33	21,33	28
	D.T	4,19	2,49	2,49	2,05	2,94	3,09	5,56	5,1	5,73	4,64	4,78	4,08
	I.M	1,29	1,07	1,04	0,98	1,01	1,08	0,94	1,08	1,18	1,08	0,94	1,08

CEPA TA1535

MES		ENSAYO 1						ENSAYO 2					
		1º FR.		2º FR.		3º FR.		1º FR.		2º FR.		3º FR.	
		-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9
Jn	M		11,67		16	6,667	15,67	19,33	15	17	19	12,33	17,33
	D.T		3,86		3,74	0,47	2,62	3,3	2,16	2,94	4,9	1,7	4,03
	I.M		1,13		1,45	0,62	1,52	1,25	1,25	1,11	1,58	0,8	1,44
Ji	M	18	17,33	18,67	32,33	17,33	28,67	20,33	13,67	20,33	24,67	19,33	24
	D.T	3,74	9,18	3,77	4,64	1,25	2,49	1,25	1,7	2,05	4,03	2,05	3,56
	I.M	1,32	0,7	1,37	1,31	1,27	1,16	1,39	0,72	1,39	1,3	1,32	1,28
Ag	M	15	17,67	11,33	11	11,33	11,67	15	18,33	15	20,33	13,67	17,33
	D.T	2,16	3,68	1,7	1,41	1,7	3,4	2,16	2,49	2,94	4,03	2,49	1,7
	I.M	1,5	1,51	1,13	0,94	1,13	1	1,02	1,04	1,02	1,15	0,93	0,98
S	M	20	22,67	19,33	16	41,67	23,33	26	13,67	22,33	14	44,33	13,33
	D.T	0,82	4,03	2,05	1,41	2,87	1,25	6,53	1,7	1,7	2,16	2,49	1,25
	I.M	1,13	1,08	1,09	0,78	2,36	1,11	1,13	0,95	0,97	0,98	1,93	0,93
O	M	15	14,67	24	13,67	19,67	13,67	21	22,33	16,33	20,33	18,67	19,67
	D.T	7,79	3,3	8,29	2,62	4,5	2,87	6,48	3,68	3,4	7,76	4,5	6,18
	I.M	1	1	1,6	1,03	1,31	1,03	1,07	1,06	0,83	0,97	0,95	0,94
N	M	16,67	18,33	10,33	9	13,67	11,67	20,67	14,67	23,67	11,33	20,67	12,67
	D.T	3,09	2,05	1,25	3	0,94	5,19	4,11	4,03	4,71	2,62	2,62	2,05
	I.M	1,52	1,45	0,94	0,71	1,24	0,92	0,93	1,19	1,06	0,92	0,93	1,03
D	M	32,33	15,33	29,67	14,33	37	18	16,67	18	15,67	16	20,33	16,67
	D.T	1,7	7,59	4,11	4,11	2,16	4,08	4,99	4,08	1,25	1,63	1,25	4,5
	I.M	1,18	1,53	1,09	1,43	1,38	1,26	1,11	1,26	1,04	1,12	1,36	1,16
E	M	11,67	15,33	19	16,33	22,67	18,67	17,67	17	22,67	20,67	24,67	22,33
	D.T	0,47	7,59	2,16	5,31	4,5	1,7	2,62	2,16	2,05	4,64	2,49	2,05
	I.M	1,25	1,24	2,04	1,32	2,43	1,51	0,84	0,94	1,08	1,15	1,17	1,24
F	M	19	32	20,33	25	16	19,33	22,33	26	21,33	22	18,33	21,33
	D.T	5,35	5,1	5,56	1,63	1,63	4,78	3,3	3,74	2,62	2,94	1,25	3,4
	I.M	1,3	1,58	1,39	1,23	1,09	0,95	1,24	1,44	1,19	1,22	1,02	1,19
Mz	M	17,33	9,333	21	9	25,33	8,667	21,33	14	21,67	20	23,67	16,33
	D.T	3,3	2,05	5,1	1,41	2,05	2,05	2,87	0,82	4,11	1,63	4,11	3,68
	I.M	1,08	1,04	1,31	1	1,58	0,96	1,25	0,76	1,27	1,09	1,39	0,89
Ab	M	11,33	11,67	19,33	9,667	18	10,33	9,667	16,67	19,67	13	13,33	14,33
	D.T	2,05	3,09	7,54	3,09	1,63	2,05	3,09	4,99	1,7	3,74	3,3	6,13
	I.M	0,72	1,52	1,23	1,26	1,15	1,35	0,67	1,43	1,37	1,11	0,93	1,23
My	M	17,33	18,67	20	21,33	15	26,33	12,67	13,67	17	13	10,67	5,667
	D.T	3,09	4,5	6,53	6,13	0,82	4,5	2,87	4,64	1,63	2,94	2,49	0,94
	I.M	1,24	1,3	1,43	1,49	1,07	1,84	1,12	1,37	1,5	1,3	0,94	0,57

CEPA TA1538

		ENSAYO 1						ENSAYO 2					
		1º FR.		2º FR.		3º FR.		1º FR.		2º FR.		3º FR.	
		-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9
		12,67	27	9,333	9	9	12,67	11,67	33	15	11	14	17,67
		2,62	5,89	0,47	1,41	0,82	2,05	5,19	5,72	2,94	2,16	4,32	1,25
		1,23	1,72	0,9	0,57	0,87	0,81	0,8	1,74	1,02	0,58	0,95	0,93
		18	25,67	13,67	23	13,33	28,67	36,33	25	39,67	25,33	33,33	27,67
		4,97	5,56	2,87	4,24	1,89	4,99	3,09	6,48	4,64	8,34	2,87	4,99
		2,16	1,2	1,64	1,08	1,6	1,34	1,51	1,15	1,65	1,17	1,39	1,28
		11,5	11,67	5,667	16	4,333	15	23,33	29	16	19,33	25,33	34,33
		2,5	4,71	0,94	4,97	1,25	3,27	3,4	2,94	2,45	2,05	2,87	6,13
		1,64	0,51	0,81	0,7	0,62	0,55	1,49	1,1	1,02	0,73	1,62	1,3
		34,67	21,33	16	16,67	18,67	21,33	22,67	27,67	17,67	24	18,33	26,33
		4,64	0,47	1,41	7,59	4,5	4,19	3,86	4,19	4,19	3,56	3,4	6,6
		2,31	1,66	1,07	1,32	1,24	1,68	1,33	1,38	1,04	1,2	1,00	1,32
		55,33	28	32,33	25,67	25,33	20	16,33	14,33	16	16,67	16,67	11,67
		5,13	6,72	4,99	2,49	4,11	1,63	1,7	3,3	0,82	4,5	4,64	1,25
		2,16	1,56	1,31	1,43	1,03	1,11	0,96	1,13	0,94	1,32	0,98	0,92
		50,67	55,67	31,67	18	33,67	41,67	30,33	51	23,33	20,67	27	31
		12,7	12,7	3,4	0	6,13	6,34	8,99	2,16	4,19	1,25	3,74	2,94
		2,23	2,29	1,4	0,74	1,49	1,71	1,38	2,55	1,06	1,03	1,23	1,55
		56,33	41,67	38,33	55	30,33	38,67	26,33	27,67	15	36	14,67	43,67
		7,59	3,09	2,49	3,74	5,44	9,74	2,62	4,92	4,97	5,35	2,05	2,05
		1,78	1,1	1,21	1,45	0,96	1,02	1,8	0,92	1,02	1,2	1	1,46
		17,33	18,33	11,67	21,33	11,67	20,33	20,33	18	14	16	18,33	14
		1,25	7,04	1,25	3,3	1,25	1,7	4,19	5,1	2,45	1,63	1,25	1,63
		1,3	1,12	0,88	1,31	0,88	1,25	1,25	1,26	0,86	1,12	1,12	0,98
		18,67	46	17,67	39,33	20,67	39,33	15,67	47,33	14,33	37,67	17,67	37,33
		3,4	2,94	2,05	3,68	3,09	5,79	1,7	2,87	4,03	2,05	4,11	2,05
		1,08	1,23	1,02	1,05	1,19	1,05	1,15	1,49	1,05	1,19	1,29	1,18
		22,33	25	14,33	23	16,67	26	21,67	37,67	13	39	15,67	40,67
		1,25	2,16	2,05	4,08	4,99	3,74	2,05	4,78	2,45	5,35	1,25	7,32
		1,37	0,97	0,88	0,9	1,02	1,01	1,27	1,05	0,76	1,08	0,92	1,13
		31	24,67	34,67	26,67	30,33	26	51,33	30	56	35,33	48,33	32
		3,74	6,18	3,86	7,04	2,62	6,53	1,7	5,35	5,72	5,19	4,92	4,32
		1,82	1,25	2,04	1,36	1,79	1,32	1,81	1,02	1,98	1,2	1,71	1,09
		27	22,33	11,67	30,33	11	27,33	25,33	31,67	13,33	40,67	14	39,33
		5,35	1,89	2,05	5,44	2,45	2,87	2,87	3,3	1,7	2,62	3,27	2,87
		2,03	0,92	0,88	1,25	0,83	1,12	1,65	0,94	0,87	1,21	0,91	1,17

CEPA TA98

		CEPA 1A56											
Jn	M	16	27	16,67	60,67	12,67	30,33	15,33	33,67	17,67	63	15,67	35,33
	D.T	1,41	2,16	1,25	7,36	1,25	3,4	2,05	3,68	1,25	8,29	2,62	7,13
	I.M	0,96	0,83	1	1,06	0,76	0,93	0,82	0,91	0,95	1,7	0,84	0,95
Ji	M	38,33	35,67	36,33	44,33	30	31,33	34,67	37	35,67	46,67	29,67	36
	D.T	4,5	6,13	1,89	7,36	0,82	2,05	1,7	2,45	4,99	3,68	4,11	4,55
	I.M	1,8	0,98	1,7	1,22	1,41	0,86	1,63	1,05	1,67	1,32	1,39	1,02
Ag	M	27	26,33	19	19,67	31,67	22	34,33	48	25,67	25	25,33	37,33
	D.T	2,16	4,99	2,45	4,5	3,4	2,45	4,64	2,94	2,87	3,27	4,5	3,4
	I.M	1,5	1,07	1,06	0,8	1,76	0,89	1,32	1,5	0,99	0,78	0,97	1,17
S	M	18,33	24	19,67	26,67	18,67	26	23,33	25	18,67	26	16	28,33
	D.T	0,94	3,74	6,94	4,11	0,47	4,55	1,25	3,27	1,25	3,27	0,82	2,49
	I.M	0,92	1,33	0,98	1,48	0,93	1,44	1,43	1,14	1,14	1,18	0,98	1,29
O	M	34,33	27,67	31	28,33	20,33	39,33	32,33	27	20	20	22,67	21,33
	D.T	4,64	8,73	2,94	2,87	3,3	2,05	0,94	4,97	1,41	8,6	2,49	3,4
	I.M	1,87	1,19	1,69	1,21	1,11	1,69	1,47	1,23	0,91	0,91	1,03	0,97
N	M	40	57,33	31,33	30,5	23,67	28,33	28	35,33	23,33	30,33	23	31,67
	D.T	8,6	8,6	3,09	6,5	6,24	3,09	5,89	7,72	4,99	4,99	3,56	2,49
	I.M	1,6	2,27	1,25	1,37	0,95	1,27	1,33	1,41	1,11	1,21	1,1	1,27
D	M	41	41	41	51	33,33	70	23,33	48	25,67	56,67	24	45,5
	D.T	4,32	1,63	2,45	7,48	5,44	6,68	5,44	7,79	4,78	4,19	5,35	3,5
	I.M	1,58	1,27	1,58	1,58	1,28	2,17	1,17	1,18	1,28	1,39	1,2	1,12
E	M	25,67	29,33	18,33	21,67	21,67	24	17,33	39,67	18	39	16	35,67
	D.T	4,92	2,05	2,87	5,79	3,68	3,56	5,25	5,91	4,55	2,94	1,63	5,73
	I.M	1,51	1,17	1,08	0,87	1,27	0,96	1,18	1,03	1,23	1,01	1,09	0,92
F	M	13,67	35,33	18,67	27	20,67	26	12,67	53,67	15,67	51,67	17	52
	D.T	0,47	6,85	3,3	5,1	2,05	3,74	2,62	5,44	2,05	8,58	1,63	10
	I.M	0,79	1,45	1,08	1,11	1,19	1,07	0,93	1,08	1,18	1,04	1,24	1,05
Mz	M	21,67	27,67	28	27	23	27,33	19,67	30,67	26,67	33	20,33	32,67
	D.T	1,89	7,85	2,94	4,55	4,32	8,73	4,71	6,13	1,7	4,32	3,4	9,98
	I.M	0,98	1,08	1,27	1,05	1,05	1,05	1,09	0,99	1,48	1,06	1,13	1,05
Ab	M	30,33	40	27,33	43,33	23	32,33	44	38,33	39,67	33,67	32,33	28
	D.T	4,5	6,16	7,36	4,5	6,35	3,09	5,89	2,49	4,5	9,81	7,69	2,45
	I.M	1,47	1,29	1,32	1,4	1,11	1,04	1,38	1,47	1,24	1,29	1,01	1,08
My	M	24,67	36,67	44	41,67	19	29,67	34,33	30,67	41,67	38,67	20,67	37
	D.T	7,04	3,3	14,3	4,5	1,63	4,64	4,64	4,5	5,79	11,9	3,3	2,83
	I.M	1,09	1,21	1,94	1,3	0,84	0,93	1,51	1,18	1,84	1,49	0,91	1,42

CEPA TA1535														CEPA TA1538													
ENSAYO 1							ENSAYO 2							ENSAYO 1							ENSAYO 2						
		1º FR.		2º FR.		3º FR.		1º FR.		2º FR.		3º FR.		1º FR.		2º FR.		3º FR.		1º FR.		2º FR.		3º FR.			
		-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9		
MES		18	10,67	12,67	10,33	8	11,33	22,67	12,67	18	14	12,67	12,33	8	8,333	8,333	24	10,67	8	12,33	15,33	12,67	30,33	17,33	13		
Jn	M	3,74	2,49	1,7	2,62	0,82	1,25	1,7	2,05	2,16	2,16	1,7	2,87	1,41	3,3	2,05	4,32	0,47	0,82	1,7	2,49	3,3	4,5	2,62	2,45		
	D.T	1,69	1,03	1,19	1	0,75	1,1	1,48	1,06	1,17	1,17	0,83	1,03	0,77	0,53	0,81	1,53	1,03	0,51	0,84	0,81	0,86	1,6	1,18	0,68		
	I.M	14,67	31,67	15	30	12,67	31,33	16	25,33	17,33	22,67	14,33	23	19,67	26,33	12,67	22	8	17,33	50,33	28	35	22	23,33	18,33		
Jl	M	4,5	8,22	1,63	5,66	2,05	7,36	2,16	2,87	4,19	2,49	2,05	4,55	6,24	8,22	2,49	5,89	0	2,05	3,4	3,27	7,26	4,08	6,25	2,87		
	D.T	1,07	1,28	1,1	1,22	0,93	1,27	1,09	1,33	1,18	1,19	0,98	1,21	2,36	1,23	1,52	1,03	0,96	0,81	2,1	1,29	1,46	1,02	0,97	0,85		
	I.M	13	15	8		17	12,67	15,67	20,33	13,67	12,33	20,33	12,33	8	22,67		23,67	4,333	18,67	13	28,67	12,67	26,33	11	27,67		
Ag	M	1,63	2,16	3,74	T	2,16	4,5	1,7	2,49	2,87	4,03	1,25	3,09	1,41	9,43	T	0,47	0,47	2,87	2,16	2,87	3,3	6,31	2,45	2,49		
	D.T	1,3	1,29	0,8		1,7	1,09	1,07	1,15	0,93	0,7	1,39	0,7	1,14	0,99		1,03	0,62	0,81	0,83	1,09	0,81	1	0,7	1,05		
	I.M	13,67	26,67	21,33	17,33	15	27	21	17,33	25	13,33	21,33	16,67	15	16	20,33	17,33	11,67	22	17	22,67	20,67	26,33	17,33	25,67		
S	M	3,4	6,55	8,65	7,41	1,63	1,63	1,63	1,25	1,63	1,25	2,87	1,25	3,66	3,27	6,13	4,99	2,05	6,16	2,45	2,49	6,55	4,19	4,5	2,87		
	D.T	0,77	1,27	1,21	0,83	0,85	1,29	0,91	1,21	1,09	0,93	0,93	1,16	1	1,26	1,36	1,37	0,78	1,74	1	1,13	1,22	1,32	1,02	1,28		
	I.M	16	13,67	21,67	15	11	10	22,33	22,33	19,33	14,33	21,33	21	45,33	20,67	28	24,67	23	18,67	19,67	15	14,67	19,33	18,33	13,67		
O	M	2,45	3,3	10,1	3,66	2,16	2,16	5,44	2,49	5,44	1,7	5,25	2,83	2,87	6,6	3,74	4,5	2,16	2,05	3,68	2,45	3,4	2,62	2,87	2,05		
	D.T	1,07	1,03	1,44	1,13	0,73	0,75	1,14	1,06	0,98	0,68	1,08	1	1,84	1,15	1,13	1,37	0,93	1,04	1,16	1,18	0,86	1,53	1,08	1,08		
	I.M	10	16	10,67	14	13,67	17	21,33	15	22	12,67	20	15,33	16,67	23	24,67	22	24,33	22,67	17	18,67	22,67	22	21	19		
N	M	2,94	5	3,09	6,38	2,62	1,41	3,3	3,74	2,45	2,05	2,45	2,87	2,62	1	2,49	9,8	6,8	5,25	1,63	1,25	2,05	2,45	2,83	3,27		
	D.T	0,91	1,26	0,97	1,1	1,24	1,34	0,96	1,22	0,99	1,03	0,9	1,24	0,74	0,95	1,09	0,9	1,07	0,93	0,77	0,93	1,03	1,1	0,95	0,95		
	I.M	20,33	18	18	12	13,33	13,67	12	20,33	13,67	14,67	11,33	17,33	32	34,33	27,33	29,67	27	34,67	16	31	15,67	23	13,33	28		
D	M	2,62	4,32	7,12	4,97	1,7	2,05	1,41	2,62	2,05	2,87	2,62	6,13	4,55	3,09	4,92	5,25	11,6	2,05	3,27	4,32	2,05	2,94	3,4	4,55		
	D.T	0,74	1,8	0,66	1,2	0,49	1,37	0,8	1,42	0,91	1,02	0,76	1,21	1,01	0,9	0,86	0,78	0,85	0,91	1,09	1,03	1,07	0,77	0,91	0,93		
	I.M	9,333	10,67	8,667	14,67	15	17	17	14	22,33	20	24,67	20,67	21,67	22	18,67	15	12	15	21,33	19,33	21	15	16,67	17,33		
E	M	1,25	3,68	2,05	3,77	1,63	4,55	3,56	4,08	2,05	3,27	1,7	4,78	4,03	7,07	1,25	5,1	2,94	3,74	1,7	4,03	3,74	2,94	5,19	33,09		
	D.T	1	0,87	0,93	1,19	1,61	1,38	0,81	0,78	1,06	1,11	1,17	1,15	1,63	1,35	1,4	0,92	0,9	0,92	1,31	1,35	1,29	1,05	1,02	1,21		
	I.M	22,67	12	13	12,67	20,33	11,67	17	10,67	21,33	16,67	19,67	12,33	4,24	3,4	4,03	2,87	3,86	6,94	4,24	2,05	4,08	1,41	2,05	2,45		
F	M	4,78	0,82	2,16	3,3	1,7	3,3	2,45	1,89	2,05	4,03	1,7	2,36	0,98	1,11	1,63	1,24	1,98	1,03	1,24	1,24	1,17	1,11	1,12	1,01		
	D.T	1,55	0,82	0,89	0,86	1,39	0,8	0,94	0,59	1,19	0,93	1,09	0,89	28,67	22,67	16,67	25,67	12,67	26,33	20	30,33	10,33	35	18,33	35,33		
	I.M	17,67	26,67	19,67	13,67	29	10,67	14,33	44,33	20	22,33	29,67	22	2,87	2,87	2,62	4,92	2,05	7,04	3,74	3,3	4,99	9,27	2,49	5,79		
Mz	M	3,09	3,86	2,87	1,25	4,32	1,25	2,05	9,81	2,94	6,24	0	4,97	1,76	0,88	1,02	1	0,78	1,03	1,18	1,06	1,08	0,97	1,08	0,98		
	D.T	1,1	2,96	1,23	1,52	1,81	1,19	0,84	2,42	1,18	1,22	1,75	1,2	27	22,33	17,33	24,67	23,67	30	36,67	32,67	34,67	26,33	36,33	38,67		
	I.M	18,67	11,67	15	14	13,33	7,333	16,33	16,67	11,67	6,667	12,67	10	2,16	2,49	4,19	1,7	5,44	1,63	2,87	1,7	3,3	2,05	6,55	5,73		
Ab	M	2,36	4,64	2,16	2,83	4,5	2,05	4,19	3,68	1,25	1,25	2,87	1,63	1,59	1,14	1,02	1,25	1,39	1,53	1,29	1,11	1,22	0,9	1,28	1,32		
	D.T	1,19	1,52	0,96	1,83	0,85	0,96	1,14	1,43	0,81	0,57	0,88	0,88	22	28,67	17	24	23,67	30	27	34	18,33	29,33	20	30,33		
	I.M	16,67	23,33	15	17	15,33	17,33	12,67	0	11,67	14,33	12	10,67	3,27	1,7	2,45	3,74	2,87	4,55	4,55	2,45	5,44	4,19	3,56	2,05		
My	M	4,5	2,87	4,9	4,9	5,79	3,09	2,05	1,7	2,05	2,62	4,08	2,49	1,65	1,18	1,28	0,99	1,78	1,23	1,76	1,01	1,2	0,87	1,3	0,9		
	D.T	1,19	1,63	1,07	1,19	1,1	1,21	1,12	1,43	1,03	1,43	1,06	1,07														
	I.M	27	28	27	40,33	12,33	37,33	28	33,67	24,33	37,67	13,67	38,67	113	116,7	79,33	70,33	135,3	76,67	104,7	139	65,67	85	113,7	95,33		
Jn	M	5,89	2,94	2,16	3,4	1,25	2,49	5,72	4,78	3,86	2,87	4,92	6,13	8,16	17,8	9,74	6,24	10,1	8,5	11,6	9,2	8,73	17,5	11,1	8,58		
	D.T	1,62	0,86	1,62	1,23	0,74	1,14	1,5	0,91	1,3	1,02	0,73	1,05	1,22	1,26	0,85	0,76	1,46	0,83	1,27	1,19	0,8	0,73	1,38	0,82		
	I.M	34,33	39	23,67	45,67	35	39	31,67	36,67	24,67	42	30,33	38,67	78,67	169	141,3	206	110	193,7	107,3	121,7	72,67	156,7	94	143		
Jl	M	2,05	4,55	2,05	7,69	5,1	2,94	5,31	1,25	2,49	2,45	4,03	4,78	8,96	4,55	12,3	5,72	8,04	7,04	9,74	6,24	5,56	14,4	9,9	6,48		
	D.T	1,61	1,07	1,11	1,28	1,69	1,07	1,48	1,04	1,16	1,19	1,42	1,09	0,83	0,96	1,49	1,25	1,16	1,17	1,04	0,88	0,71	1,14	0,91	1,04		
	I.M	23	25,33	22,67	30,67	21,67	18,33	28,67	34	30	38,33	30,67															